



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ELABORACIÓN DE UNA PELÍCULA ACTIVA UTILIZANDO COMPUESTOS  
ANTIBACTERIANOS PRODUCIDOS POR ENTEROCOCCUS SPP.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
Thania Robles Camacho**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Facultad de Química, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Amelia Farrés González-Saravia  
Facultad de Química, UNAM**

**Dra. Romina de la Paz Rodríguez Sanoja  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Ciudad de México. Marzo, 2019**



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.

## ELABORACIÓN DE UNA PELÍCULA ACTIVA UTILIZANDO COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS PRODUCIDOS POR ENTEROCOCCUS SPP.

Jurado asignado:

Presidente Dr. Sánchez Esquivel Sergio	IIB, UNAM
Vocal Dra. Wachter Rodarte María del Carmen	FQ, UNAM
Vocal Dra. Montiel Pacheco Carmina	FQ, UNAM
Vocal Dr. Navarro Ocaña Arturo	FQ, UNAM
Secretario Dr. López Munguía Canales Agustín	IBT, UNAM

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del departamento de Alimentos y Biotecnología en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

El Comité Tutorial estuvo integrado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia	FQ, UNAM
Dra. Romina de la Paz Rodríguez Sanoja	IIB, UNAM

Se agradece el financiamiento del proyecto por el programa DGAPA PAPIIT IN222717: Estudio y aplicaciones de las proteínas y péptidos obtenidas del metagenoma y bacterias de quesos tradicionales mexicanos, junto con el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con la clave 5000-9102.

## **Agradecimientos**

Al esfuerzo y trabajo de todo mexicano cuyas aportaciones contribuyen al sustento de la educación pública.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el compromiso en la formación integral de sus profesionales, por la continua labor del desarrollo en la investigación científica y por promover el desarrollo de los individuos para el bien del país.

Al CONACYT por haberme brindado la beca de posgrado durante la maestría.

Al Programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico brindado para la asistencia al séptimo Congreso de microbiólogos europeos (FEMS) llevado a cabo en Valencia, España del 9 al 13 de julio de 2017.

Al programa DGAPA PAPIIT IN222717: Estudio y aplicaciones de las proteínas y péptidos obtenidas del metagenoma y bacterias de quesos tradicionales mexicanos, junto con el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con la clave 5000-9102 por el financiamiento del proyecto.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por haberme guiado en la investigación científica y haberme proporcionado su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del comité tutorial, a la Dra. Amelia Farrés González-Saravia y a la Dra. Romina de la Paz Rodríguez Sanoja por haber estado al pendiente del avance del proyecto y haber participado activamente con sus recomendaciones.

A los miembros del jurado por su tiempo dedicado a la lectura del trabajo y haber sugerido las correcciones pertinentes.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel y a la Ing. Mariana Ramírez Gilly por haber facilitado el equipo SINTECH 1/S y por la asesoría técnica para la medición de las características físicas de la biopelícula desarrollada en este trabajo.

## INDICE

Resumen	1
1. Envases para alimentos	2
1.1 Envases con actividad antimicrobiana	3
2. Componentes de la película antimicrobiana	5
2.1 Bioplásticos	5
2.1.1 Almidón	6
2.1.2 Alginatos	8
2.2 Plastificantes	10
2.3 Agentes antimicrobianos	10
2.3.1 Peptidoglucano hidrolasas	12
2.3.2 Bacteriocinas	14
2.3.3 <i>Enterococcus faecalis</i> FAIR E-77 como cepa productora de agentes antimicrobianos	18
2.4 Incorporación de agentes antimicrobianos en envases bioactivos	18
2.4.1 Inmovilización	19
2.5 Pruebas de efectividad de los envases antimicrobianos	20
3. Aplicaciones	22
3.1 Productos cárnicos refrigerados	23
3.2 Microorganismos patógenos y de descomposición	23
4. Justificación	25
5. Hipótesis	25
6. Objetivos	25
7. Metodología	26
8. Resultados y análisis	36
8.1 Elección de formulación para la biopelícula	36
8.1.1 Pruebas mecánicas	38
8.2 Producción del extracto con actividad antimicrobiana	41
8.2.1 Cinética de crecimiento del microorganismo productor	41
8.2.2 Halos de inhibición del sobrenadante	42
8.2.3 Halos de inhibición del liofilizado	43
8.3 Pruebas a la película antimicrobiana	45
8.3.1 Pruebas mecánicas	45
8.3.2 Inhibición bacteriana con respecto al almacenamiento de la película	47
8.3.3 Actividad antibacteriana en extracto e inmovilizada	49
8.4 Identificación de proteínas	50
8.4.1 Zimogramas	50
8.4.2 Secuencias peptídicas	51
9. Conclusiones	57
10. Bibliografía	58

## Índice de tablas y figuras

### TABLAS

<i>Tabla 1. Propiedades generales de los gránulos de almidón de maíz y almidón de papa (Fennema, 1998).....</i>	<i>8</i>
<i>Tabla 2. Ejemplos de agentes antimicrobianos utilizados en envases antimicrobianos.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 3. Formulaciones para la elaboración de las películas a base de almidón de maíz y papa.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 4. Formulaciones para la elaboración de las películas a base de alginato.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 5. Procedencia de las cepas.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 6. Selección cualitativa de las diferentes formulaciones.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 7. Espesor de las películas de almidón (se expresa el promedio y la desviación estándar en cm.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 8. Permeabilidad al vapor de agua promedio de las películas.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 9. Tabla de análisis de características de las películas para elección de formulación.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 10. Relación de los mm del halo de inhibición (diámetro del halo) con respecto a los miligramos de proteína contenidos en el sobrenadante de prueba.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 11. Relación de los mm del halo de inhibición (diámetro del halo) con respecto a los miligramos de proteína contenidos en el liofilizado resuspendido en buffer.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 12. Características de la película con actividad antimicrobiana.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 13. Inhibición antibacteriana debajo del área de la película con respecto al almacenamiento de la película.....</i>	<i>47</i>

### FIGURAS

<i>Figura 1. Materiales empleados mundialmente en la industria del envasado.....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. (A) Estructura de la amilosa. (B) Estructura de la amilopectina.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 3. Estructura del alginato. (A) G = ácido <math>\alpha</math>-L-gulurónico (B). M = ácido D-manurónico (C) GM = ácido <math>\alpha</math>-L-gulurónico y ácido D-manurónico .....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Interacción del alginato con iones calcio para formar una red.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 5. Esquema de la estructura de la cubierta bacteriana a) Gram negativo, b) Gram positivo .....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 6. Especificidad de sustrato de las peptidoglucano hidrolasas.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 7. Dominios estructurales típicos en una peptidoglucano hidrolasa .....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 8. Estructura tridimensional de la enterocina AS-48 con <math>\alpha</math>-hélices representadas por cilindros .....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 9. Representación esquemática del mecanismo de acción de AS-48 .....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 10. Representación esquemática de la inmovilización mediante atrapamiento .....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 11. Esquema representativo de la señal típica obtenida en el equipo de pruebas SINTECH 1/S durante la punción o extensión de una película .....</i>	<i>22</i>

Figura 12. Porcentaje de solubilidad de las películas AP1 (almidón de papa formulación 1), AM3 (almidón de maíz formulación 3) y AM1 (almidón de maíz formulación 1) y Alginato .....	37
Figura13. Esfuerzo en fractura en penetración de las películas.....	39
Figura 14. Esfuerzo en fractura en tracción de las películas.....	39
Figura 15. Crecimiento de <i>E. faecalis</i> en medios BHI y MRS. Se indican tres etapas de crecimiento bacteriano: a) fase exponencial; b) fase estacionaria y c) fase estacionaria tardía.....	42
Figura 16. Halos de inhibición producidos por el sobrenadante de la cepa <i>E. faecalis</i> en medio MRS.....	43
Figura 17. Halos de inhibición producidos por el sobrenadante de la cepa <i>E. faecalis</i> en medio BHI.....	43
Figura 18. Halos de inhibición del liofilizado resuspendido contra la bacteria <i>L. monocytogenes</i> . Control positivo nisaplin 10 mg/mL y control negativo: medio BHI liofilizado y resuspendido en buffer de fosfatos pH 7.....	44
Figura 19. Difusión en agar de la película con actividad antimicrobiana al tiempo cero contra <i>P. aeruginosa</i> .....	48
Figura 20. Difusión en agar de la película con actividad antimicrobiana después de 7 días de almacenamiento contra <i>P. aeruginosa</i> .....	48
Figura 21. Crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> y el efecto bacteriostático de la adición del extracto antimicrobian.....	49
Figura 22. Crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> y el efecto bacteriostático de la adición de la película antimicrobiana.....	50
Figura 23. Perfil proteico y actividad lítica del liofilizado. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 perfil proteico teñido con azul de Commasie; carriles 3, 4, 5, 6 y 7, Zimogramas contra <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. tiphymurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>Y. enterocolitica</i> , respectivamente. (SDS-PAGE 14%). Proteína total por pozo 25 µg.....	51

## RESUMEN

Los brotes de infecciones transmitidas por alimentos conducen hacia una investigación con alternativas innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos y mantener calidad, frescura y seguridad alimentaria. Para cumplir con los requisitos mencionados, se propone el uso de envases activos con propiedades antimicrobianas.

En el presente proyecto se desarrolló una biopelícula con actividad antimicrobiana cuyo principal uso propuesto es cubrir la superficie de productos cárnicos y contribuir a su inocuidad. Con el fin de obtener dicha biopelícula se empleó almidón de maíz, que adicionado con glicerol constituía una matriz porosa para la inmovilización de los compuestos antimicrobianos.

Como cepa productora de los compuestos antimicrobianos (peptidoglucano hidrolasas y una bacteriocina) se utilizó *E. faecalis* FAIR E-77, originalmente aislada de queso italiano, que ha sido ampliamente estudiada y se sabe que produce la enterocina AS-48 y cuya actividad lítica contra patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Shigella* y *Klebsiella* es resaltable.

Para la elaboración de la biopelícula se concentraron los agentes antibacterianos extracelulares de *E. faecalis* y posteriormente se inmovilizaron. Consecuentemente se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana contra microorganismos y se evaluó el efecto antimicrobiano durante cierto periodo de almacenamiento de la película, encontrando que, durante 7 días de almacenamiento a 4°C la película se mantiene con actividad contra *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* y *S. Typhimurium*.

Se realizó también la caracterización mecánica y estructural de la biopelícula, de la cual se puede concluir que la mayoría de los aspectos son equiparables con una biopelícula funcional, sin embargo, es deseable poder aumentar la resistencia a la extensión de la película.

Finalmente, dentro de las proteínas con actividad antimicrobiana presentes en el concentrado extracelular de *E. faecalis* FAIR E-77 se identificaron tres proteínas que pertenecen al grupo de las peptidoglucano hidrolasas.



## 1. Envases para alimentos

Con base en lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”, se considera como envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

En el presente trabajo se discutirá lo relativo a envases primarios, es decir, el envase que está en contacto directo con el alimento. La principal función del envase es proteger el contenido que se encuentra dentro de éste y el material del que esté hecho debe de ser inocuo (NOM-251-SSA1-2009).

A lo largo de los años los alimentos han sido envasados en diferentes tipos de materiales – papel, madera, fibras vegetales, hojas de plantas, vidrio, metales, plásticos, etcétera. Algunas veces, la combinación de dos o más materiales es necesaria para ofrecer la mejor opción de envasado en ciertos productos alimenticios. La selección adecuada del tipo de material empleado para el envasado de un alimento depende principalmente de las propiedades y tipo de alimento a envasar. Además, la imagen en el mercado, el costo y los asuntos ambientales también deben de ser considerados (Han, 2014).

Dentro de los materiales más utilizados mundialmente en la industria del envasado encontramos en primer lugar al papel/cartón y en segundo lugar los plásticos (Figura 1.)

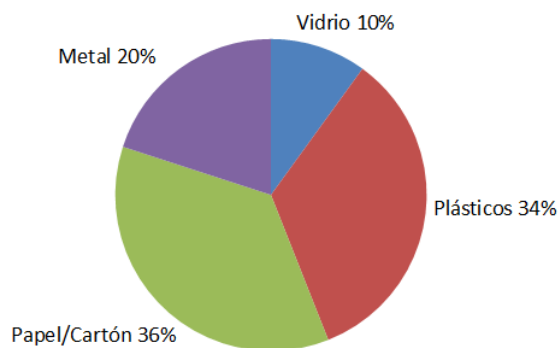


Figura. 1 Materiales empleados mundialmente en la industria del envasado. (Han, 2014).

Abordaremos particularmente la parte de los plásticos debido a que es la relacionada con el proyecto aquí desarrollado. En general, los plásticos son ampliamente usados debido a que presentan las siguientes ventajas en el envasado:

- Peso muy ligero y precio muy bajo con significativa resistencia comparado con otros materiales

- Excelentes propiedades de barrera de gases y vapor de agua
- Fácilmente combinable con otros materiales de envasado (Han, 2014).

Debido a que el principal objetivo del proyecto consistía en la elaboración de una biopelícula con actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y de descomposición en carne, se buscó un reemplazo al material comercial egapack, que es una película auto adherible de policloruro de vinilo. Dicha película se utiliza en la industria alimenticia para recubrir los cortes de carnes que están a la venta en supermercados. Al incluir compuestos antimicrobianos en el mismo envase, este último se considera entonces como un envase activo.

### **1.1 Envases con actividad antimicrobiana**

Los envases activos emergen como un concepto innovador en el área de envasado, como una respuesta a los continuos cambios en la demanda de los consumidores y las tendencias en el mercado. Se consideran envases activos a aquellos en los que el envase y el producto interactúan para extender la vida de anaquel del alimento, o bien contribuyen a la inocuidad o a las propiedades sensoriales del alimento mientras se mantiene la calidad del mismo (Suppakul, 2003).

Los envases antimicrobianos son una forma de envases activos, los cuales se caracterizan por interactuar con el producto o el espacio entre el envase y la matriz alimenticia, para reducir la carga microbiana e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Inicialmente introducidos al mercado en Japón a mediados de los 70's, los envases activos e inteligentes lograron captar la atención de la industria en Europa y Estados Unidos hasta mitad de los años 90's. Durante la última década la utilización de este tipo de envases ha incrementado.

Los envases antimicrobianos actúan para reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que puedan estar presentes en el producto alimenticio, es decir, los principales propósitos de estos son: favorecer la inocuidad, extender la vida de anaquel y mantener la calidad del alimento (Malhotra, 2015).

Dentro de las ventajas al utilizar un envase antimicrobiano se encuentran:

- el control eficiente de la contaminación en la superficie
- la protección a alimentos con alta actividad acuosa
- la retención prolongada de la actividad antibacteriana
- la extensión de la vida de anaquel del alimento

- la reducción del riesgo del desarrollo de patógenos en el alimento
- la disminución del uso de aditivos

### **Tipos de envases antimicrobianos**

Los envases antimicrobianos pueden producirse y actuar de diferentes formas, dentro de las cuales existen:

1. Adición de bolsas o almohadillas al envase en las que se contengan agentes antimicrobianos.

La aplicación comercial más exitosa consiste en la adición de almohadillas que funcionan como absorbentes de oxígeno o de humedad. Este tipo de almohadillas son ampliamente utilizados en panadería, pastas y en productos cárnicos para evitar la oxidación y condensación de agua.

2. Incorporación de agentes antimicrobianos directamente al polímero.

La razón por la cual se incorporan compuestos antimicrobianos al envase es para prevenir el crecimiento bacteriano en alimentos cuya descomposición ocurre principalmente en la superficie.

3. Revestimiento o adsorción de antimicrobianos al material de envasado.

Para el caso de los compuestos antimicrobianos cuyas propiedades se ven afectadas debido a la temperatura empleada en el proceso de elaboración de polímeros puede emplearse el revestimiento del material, o bien agregarse durante el moldeo de las películas.

4. Inmovilización de antimicrobianos mediante uniones covalentes o iónicas con el envase.

Este tipo de inmovilización requiere la presencia de grupos funcionales tanto en el compuesto antimicrobiano como en el material de envasado.

5. Uso de polímeros que intrínsecamente tengan propiedades antimicrobianas.

Algunos polímeros son intrínsecamente antimicrobianos, dentro de estos se encuentran los polímeros catiónicos como el quitosano y la L-polilisina que favorecen la adherencia de las células debido a que las aminas cargadas interactúan con las cargas negativas en la membrana celular, provocando la pérdida de componentes intracelulares (Appendini, 2002).

En este proyecto los compuestos antimicrobianos que se emplearon son enzimas, de las cuales posteriormente se proporcionará mayor información, sin embargo, el método de inmovilización elegido debía ser aquel en el cual la temperatura no modificara la actividad antimicrobiana, con base en esto se optó por producir un envase mediante adsorción de antimicrobianos al material de envasado, es decir, las enzimas se inmovilizaran en la biopelícula.

## **2. Componentes de la película antimicrobiana**

Para poder producir una biopelícula con propiedades antimicrobianas se requiere inicialmente de algún polímero que constituya la base estructural de la biopelícula, un plastificante que ayude a mejorar las propiedades mecánicas y finalmente el agente con actividad antimicrobiana.

Las propiedades mecánicas, físicas, químicas y microbiológicas determinan la eficacia de un envase antimicrobiano, en particular para cierto alimento en específico. Dentro de los materiales que pueden utilizarse para elaborar un envase antimicrobiano se encuentran los materiales biodegradables, como el almidón, celulosa, proteínas, poli-hidroxibutirato, y otros materiales sintéticos derivados del petróleo. Algunos polímeros no son dúctiles o suficientemente flexibles para utilizarse comercialmente como material de envase, así que comúnmente se modifican mediante la plastificación. La plastificación puede modificar las propiedades térmicas, mecánicas y de barrera de los polímeros. Generalmente mejora la procesabilidad (por ejemplo, reduce la temperatura del proceso, reduce la adhesión al molde) y flexibilidad de los plásticos.

Finalmente, para poder producir una película antimicrobiana se requiere la acción de algún agente antimicrobiano. Uno de los principales factores para poder elegir un agente antimicrobiano consiste en determinar el tipo de microorganismos contra los que tendrá acción. Existen múltiples sustancias antimicrobianas que pueden utilizarse en envases, usualmente se encuentran los antioxidantes, productos biotecnológicos (como las enzimas y bacteriocinas), antimicrobianos naturales, aceites esenciales, etc (Malhotra, 2015).

### **2.1 Bioplásticos**

Los bioplásticos han ganado una notable atención por parte de los consumidores, inversionistas y manufactureros alrededor del mundo durante los últimos 20 años debido a que se producen a partir de fuentes renovables y son reconocidos como una solución al problema ambiental ligado a la pérdida y dependencia de combustibles fósiles. Dentro de las principales ventajas de su utilización se encuentra su biodegradación. El almidón y el

ácido poliláctico son los materiales más ampliamente usados en el mercado de los bioplásticos (Park, 2014).

Los bioplásticos pueden clasificarse en cuatro categorías con base en su composición química, origen y método de síntesis:

1. Bioplásticos obtenidos directamente de biomasa (por ejemplo: almidón, proteínas, celulosa).
2. Bioplásticos producidos mediante síntesis química de monómeros bioderivados (por ejemplo: ácido poliláctico, bio-based polietileno).
3. Bioplásticos producidos por fermentación microbiana (por ejemplo: polihidroxialcanoatos).
4. Bioplásticos producidos mediante síntesis química, tanto de monómeros bioderivados, como de monómeros a base de petróleo (por ejemplo: succinato de polibutileno, politrimetilentereftalato).

### **2.1.1 Almidón**

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes, se forma como reserva en las hojas, tallo, raíces, semillas, fruta y polen de muchas plantas, por lo tanto, es usualmente empleado como materia prima en la dieta de los seres humanos. Sus características físicas y químicas pueden distinguirse claramente de las de cualquier otro carbohidrato. Se encuentra en forma de gránulos simples, parcialmente cristalino, cuyo tamaño, forma y temperatura de gelatinización dependen de la procedencia botánica del almidón. Los almidones más sencillos proceden de semillas (trigo, maíz, cebada) y raíces (papas, camote, mandioca/tapioca).

El almidón es un homopolisacárido compuesto de unidades de glucosa y está formado por una mezcla de 2 polímeros, amilosa y amilopectina. La mayor parte de la amilosa es una cadena lineal de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), contiene algunas ramificaciones, las cuales representan 0.3-0.5% de los enlaces. Las moléculas de amilosa tienen pesos moleculares de alrededor de  $10^6$ . Esta cadena adopta una disposición helicoidal y tiene seis monómeros por cada vuelta de hélice. Suele constituir alrededor del 25 al 30 % del almidón. La amilopectina también está formada por  $\alpha$ -D-glucopiranosas, aunque en este caso conforma una cadena altamente ramificada en la que hay uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), como se indicó en el caso anterior, y muchos enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) que originan lugares de ramificación cada 15-25 monómeros. Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de un racimo y se presentan como dobles hélices. Su peso molecular es muy elevado, desde  $10^7$  hasta  $5 \times 10^8$ , ya que cada molécula suele reunir de 2000 a 200 000 unidades de glucosa (Verbeek y Bier, 2011).

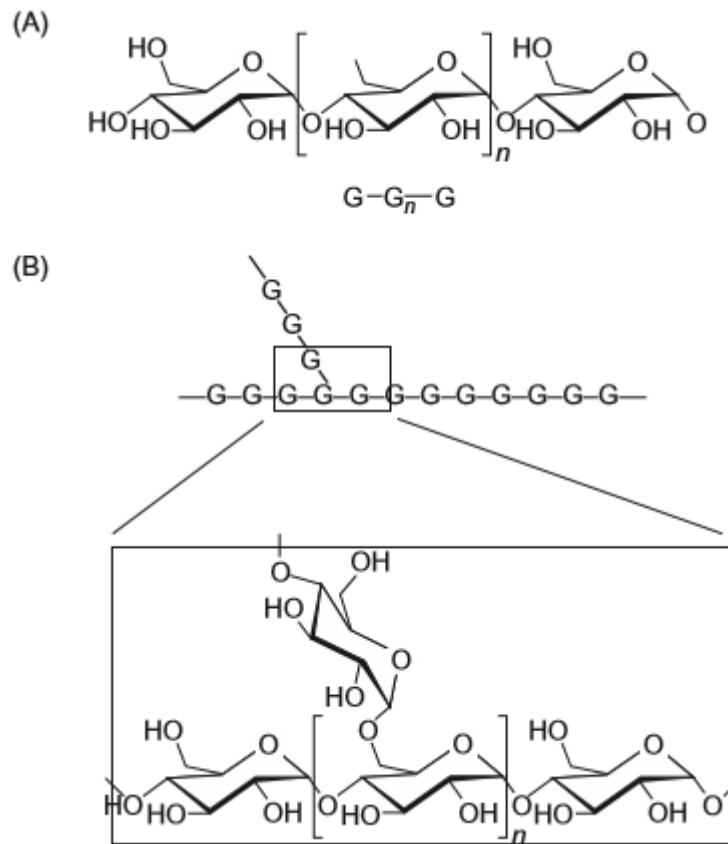


Figura 2. (A) Estructura de la amilosa. (B) Estructura de la amilopectina.  
 Youngjae Byun and Young Teck Kim. Chapter 14

El almidón tiene la propiedad de solubilizarse al incrementar la temperatura. El calentamiento continuo de los gránulos de almidón en un exceso de agua resulta en un mayor hinchamiento de los gránulos, lixiviación adicional de componentes solubles y, eventualmente, disrupción total de los gránulos. Este fenómeno resulta en la formación de un gel. Las propiedades del gel formado dependen de la proporción entre amilosa y amilopectina, la cual varía según el organismo en el que se encuentre.

Tabla 1. Propiedades generales de los gránulos de almidón de maíz y almidón de papa (Fennema, 1998).

	Almidón de maíz	Almidón de papa
Tamaño de granulo (eje mayor, $\mu\text{m}$ )	2-30	5-100
Amilosa (%)	28	21
Temperatura de gelatinización ( $^{\circ}\text{C}$ )	62-80	58-65
Viscosidad relativa	Media	Muy alta
Claridad de la pasta	Opaca	Clara

### 2.1.2 Alginatos

Producidos especialmente por algas pardas (Phaeophyta), la cantidad y calidad del alginato extraído depende de la especie de alga y de la temporada. La producción mundial de alginato es de aproximadamente 40,000 toneladas por año, de los cuales, 30% es destinada a la industria alimenticia. Los alginatos también pueden ser producidos por bacterias como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas* sp. El alginato es extraído de las algas con carbonato de sodio, la sal puede cambiarse a la forma ácida mediante tratamiento con HCl diluido. Los alginatos están conformados por tres tipos de bloques: bloques alternados de M (M = ácido D-manurónico) y G (G = ácido  $\alpha$ -L-gluconico), bloques de GG y bloques de MM, su estructura está representada en la Figura 3.

Los bloques G están asociados a la formación de geles en presencia de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$ . A pH bajo, los alginatos forman geles ácidos mediante la estabilidad de los puentes de hidrógeno formados. En la Figura 4 se ilustra la formación de redes al gelificar.

La viscosidad de las soluciones de alginato permanece casi constante cuando el pH se encuentra entre 6 y 8, a  $\text{pH} < 4.5$  la viscosidad aumenta. Debido a su estructura lineal y alto peso molecular, forman películas, la formación de geles es una de sus características más importantes. Por lo tanto, los alginatos pueden ser procesados y producir: cápsulas, recubrimientos, fibras y películas. Los alginatos han sido ampliamente utilizados para inmovilizar enzimas como la glucosa oxidasa, lipasa, dextranasa y papaína (Ben Amara, *et al*, 2016).

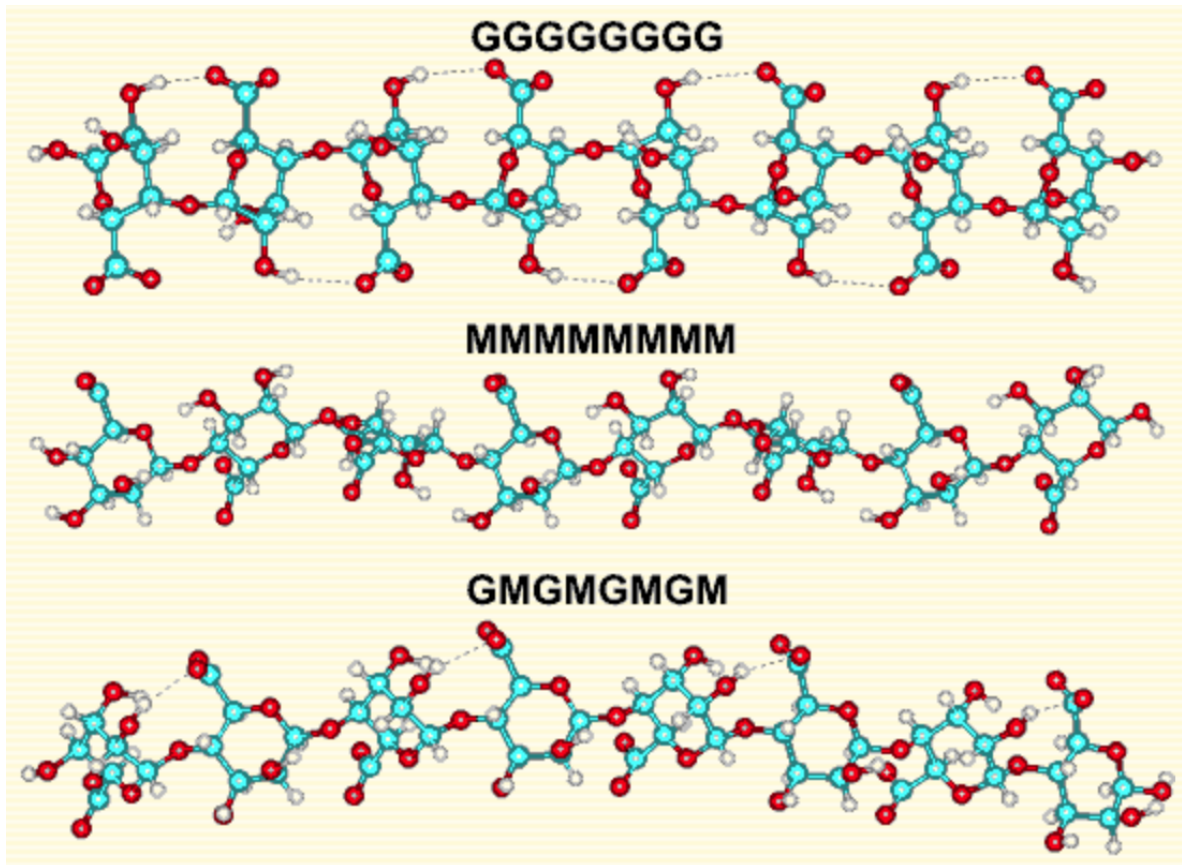


Figura 3. Estructura del alginato. (A) G = ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (B) M = ácido D-manurónico (C) GM = ácido  $\alpha$ -L-gulurónico y ácido D-manurónico (<http://www1.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>)

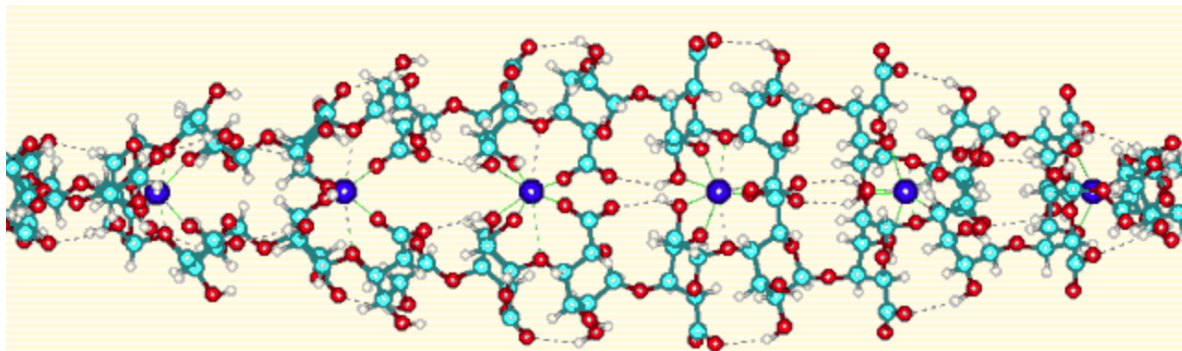


Figura 4. Interacción del alginato con iones calcio para formar una red. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>



## **2.2 Plastificantes**

Los plastificantes son aditivos que incrementan la flexibilidad de los materiales. Generan que el material de envase fluya a temperaturas más bajas, evitando así el aumento de las temperaturas de proceso. En general, los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena polimérica, incrementando así los movimientos de la cadena. La adición de plastificantes reduce la temperatura de transición vítrea (Tg). Generalmente, al aumentar la cantidad de plastificante disminuye la Tg debido a que las regiones amorfas plastificadas atraviesan una transición de fase de un estado en el que pasan de un sólido mecánico capaz de soportar su propio peso frente al flujo, a un estado en el cual un líquido subenfriado puede exhibir flujo viscoso. Los plastificantes con un peso molecular bajo son más eficientes. Además, debe de considerarse que, la higroscopicidad del plastificante modificara de una manera diferente la Tg de la película a formar (Byun, 2014).

Existen diversos plastificantes, para biopolímeros generalmente se utilizan monosacáridos (glucosa), oligosacáridos (sacarosa), polioles (glicerol, xilitol, sorbitol), lípidos (ácido láurico, ácido mirístico) o sus derivados. Los plastificantes contienen diferente número de grupos hidroxilo, por lo tanto, una amplia variedad de biopolímeros puede producirse utilizando diversos plastificantes.

## **2.3 Agentes antimicrobianos**

Los agentes antimicrobianos juegan dos roles importantes: el efecto bacteriostático y el efecto bactericida. En el primer caso reducen la velocidad de crecimiento del microorganismo blanco. En el segundo caso inhiben alguna ruta metabólica esencial de los microorganismos o bien desestabilizan la estructura de la pared celular/membrana celular.

Existen compuestos potencialmente útiles para ser incorporados en envases, como son: enzimas (lactoperoxidasa) péptidos antimicrobianos (magaininas, cecropinas, defensinas), fenoles (hidroquinonas y catequinas), ésteres de ácidos grasos, antibióticos y metales (cobre). En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de agentes antimicrobianos usados en polímeros en envases de alimentos.

Tabla 2. Ejemplos de agentes antimicrobianos utilizados en envases antimicrobianos.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Polímero/Soporte</b>	<b>Microorganismo blanco</b>
<b>Ácidos orgánicos</b> (propiónico, benzoico, sorbico, acético, láctico y málico)	Películas comestibles, EVA, LLDPE	Hongos
<b>Gases inorgánicos</b> (dióxido de azufre, dióxido de cloro)	Poliiolefinas	Hongos, bacterias y levaduras
<b>Metales</b> (plata)	Poliiolefinas	Bacteria
<b>Fungicidas</b> (benomilo, imazalil)	LDPE	Hongos
<b>Bacteriocinas</b> (nisina, pediocinas, lacticina)	Películas comestibles, celulosa, LDPE	Bacterias gram positivo
<b>Enzimas</b> (lisozima, glucosa oxidasa)	Celulosa, PS, películas comestibles	Bacterias gram positivo
<b>Agentes quelantes</b> (EDTA)	Películas comestibles	Bacterias gram negativo
<b>Aceites esenciales</b> (extracto de semilla de uva, hinokitiol)	LDPE, celulosa	Hongos, levaduras y bacterias
<b>Parabenos</b> (popilparabeno, etilparabeno)	Celulosa cubierta con arcilla, LDPE	Hongos

(Appendini P. y Hotchkiss J.H., 2002)

Muchos antimicrobianos son incorporados en 0.1-5% (w/w) del material de envase, particularmente en películas. Los agentes antimicrobianos deben ser añadidos a los polímeros durante la fundición o mediante algún solvente. Los métodos de procesamiento térmico para polímeros como la extrusión deben ser usados únicamente con antimicrobianos térmicamente estables. Las zeolitas de plata, por ejemplo, pueden soportar altas temperaturas (arriba de 800°C) y han podido incorporarse como una capa co-estrujada con otros polímeros (Appendini, 2002).

En cuanto a los antimicrobianos termo-sensibles como son las enzimas y los compuestos volátiles, el uso de disolventes puede ser más apropiado para su incorporación en

polímeros. La lisozima, por ejemplo, ha sido incorporada en películas de celulosa mediante la adición de un disolvente para prevenir desnaturalización de la enzima. En el método de incorporación mediante el disolvente, es importante mencionar que ambos, el antimicrobiano y el polímero deben de ser solubles. Los biopolímeros resultan entonces buenos candidatos para este tipo de formación de películas incluyendo proteínas, carbohidratos y lípidos que actúan como plastificantes.

Una gran cantidad de agentes antimicrobianos, incluyendo etanol, iones de plata, antibióticos, enzimas, bacteriocinas, ácidos orgánicos y aceites esenciales han sido probados para inhibir el crecimiento bacteriano en alimentos. De entre estos, los extractos de plantas, péptidos y nisina se encuentran dentro de los más empleados, por ejemplo, un envase antibacteriano cuyo agente es la nisina ha sido empleado para retardar el crecimiento de bacterias viables y bacterias ácido lácticas de carne de hamburguesa almacenada a 4 °C y prolongar su vida de anaquel (Fang Z., *et al.*, 2017).

En el caso particular de enzimas utilizadas como agentes antimicrobianos tenemos quitinasa,  $\beta$ -glucanasa, glucosa oxidasa, lactoperoxidasa y lisozima (Suppakul, P., *et al.*, 2003), la lisozima es la única enzima que hidroliza el peptidoglucano, siendo este componente de la pared celular bacteriana, por lo cual se considera de interés la aplicación de este tipo de enzimas.

### **2.3.1 Peptidoglucano hidrolasas**

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) representan un amplio grupo de enzimas cuyo sustrato es el peptidoglucano, es decir, el componente más importante de la pared celular bacteriana. Las PGHs se encuentran en organismos diversos incluyendo animales, plantas, protozoarios, bacterias y virus, aunque su función es distinta en cada uno. Las lisosimas animales, por ejemplo, tienen un papel fundamental al formar parte del sistema inmune innato de defensa proporcionando protección contra patógenos bacterianos. La actividad de estas enzimas resulta en la ruptura de la pared celular y la consecuente lisis celular. Participan en muchos procesos fisiológicos en el ciclo de vida bacteriano; un tipo (endolisinas) representan un importante mecanismo de defensa contra bacteriófagos otro es necesario en el proceso de reensamblaje del peptidoglucano (autolisinas) o pueden también competir contra diferentes bacterias (bacteriocinas) (Callewaert, 2011).

Las bacterias Gram positivas son un blanco importante de las peptidoglucano hidrolasas debido a que en este caso la capa de peptidoglucano (Figura 5) sirve como la primera línea de defensa de la integridad celular y las PGHs al hidrolizar dicha capa, pueden provocar la lisis celular.

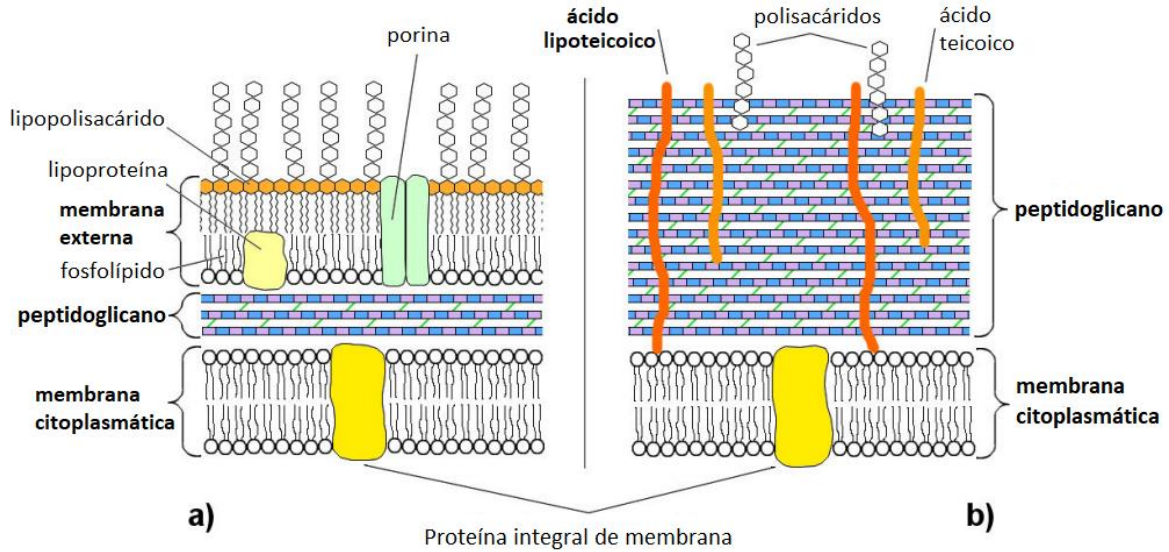


Figura 5. Esquema de la estructura de la cubierta bacteriana a) Gram negativa, b) Gram positiva (Maliničová et al., 2010)

Con base en el enlace específico de hidrólisis en el peptidoglucano, las peptidoglucano hidrolasas pueden dividirse en (Figura 6): Glucosidasas (N-acetilglucosaminidasas y N-acetilmuramididasas) hidrolizan el enlace  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 entre las cadenas del glucano, la diferencia radica en que las primeras dejan un extremo reductor de N-Acetilglucosamina, en tanto que las últimas dejan un extremo reductor N-Acilmurámico; Carboxipeptidasas, producen péptidos pequeños hidrolizando el enlace del extremo C-terminal; Endopeptidasas, hidrolizan el enlace péptidico situados en el centro del péptido; Amidadasas (N-acilmuramoil-L-alanina amidadasas) hidrolizan el enlace amida entre el glucano y la parte peptídica. La especificidad hidrolítica depende del dominio catalítico de la enzima.

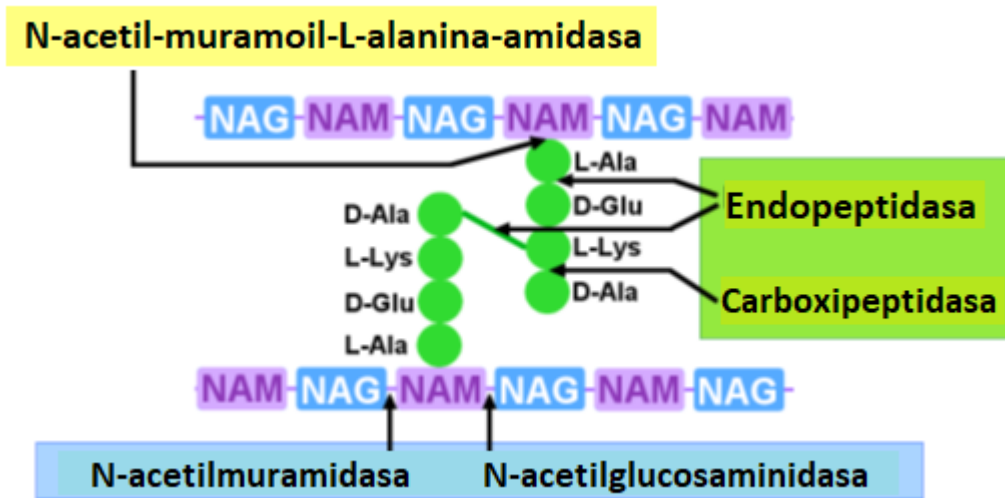


Figura 6. Especificidad de sustrato de las peptidoglucano hidrolasas. (Maliničová et al., 2010)

La mayoría de las peptidoglucano hidrolasas se componen de dos dominios (Figura 7). Salvo algunas excepciones, el dominio N-terminal contiene la actividad catalítica (glucosidasa, amidasa o peptidasa) y es responsable de la ruptura de enlaces en el sustrato. En algunos casos, dos o inclusive tres dominios catalíticos pueden estar presentes en una enzima.

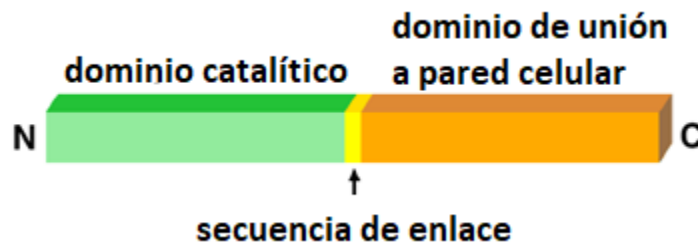


Figura 7. Dominios estructurales típicos en una peptidoglucano hidrolasa. (Maliničová et al., 2010)

### 2.3.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas se caracterizan por ser péptidos que presentan actividad antagonista contra bacterias diferentes de la célula productora, la cual cuenta con un mecanismo de inmunidad contra su propia bacteriocina. Las bacteriocinas son producidas por diferentes especies de BAL (bacterias ácido lácticas). Entre otras bacterias, actualmente han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad de conservar alimentos de origen animal y vegetal contra un amplio espectro de microorganismos de descomposición y patógenos. Son consideradas como alternativas a conservadores químicos debido a que son inofensivas para las células eucarióticas, usualmente pueden mantener su actividad

en un amplio intervalo de pH y temperatura, además se hidrolizan con las enzimas proteolíticas en el estómago debido a su naturaleza proteínica (García, 2010).

Debido a la diversidad de las bacteriocinas actualmente estudiadas, éstas se han clasificado en cuatro grupos: Clase I. Enterocinas lantibioticas modificadas post traduccionalmente; Clase II. Péptidos lineales no modificados cuya masa molecular es menor a 10 kDa; Clase III. Péptidos cíclicos; Clase IV proteínas de mayor peso molecular, lábiles al calor.

### **Potencial biotecnológico de la enterocina AS-48 para conservar alimentos**

La enterocina AS-48 es una bacteriocina que se encuentra codificada en un plásmido, su actividad fue reconocida por vez primera en *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48, una cepa aislada durante una búsqueda de enterococos productores de bacteriocinas (Galvez *et al.*, 1986). Un estudio basado en amplificación por PCR mostró que la habilidad de producir péptidos idénticos o similares a AS-48, se encuentra ampliamente distribuida entre los enterococos. Sin embargo, ninguna de las cepas productoras ha sido reconocida como GRAS (generalmente reconocida como segura, por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe), ya que los enterococos son organismos considerados como patógenos oportunistas. Por una parte, se les han atribuido roles benéficos como la producción de bacteriocinas contra *Listeria*, contribución a la maduración y desarrollo de sabor en quesos artesanales madurados, como probióticos para mejorar el equilibrio de la microbiota en el intestino y para tratar la gastro enteritis en humanos y animales. Por otra parte, se cuestiona la seguridad de la utilización de los enterococos debido a su participación en infecciones clínicas: bacteremia, endocarditis e infecciones del tracto urinario (Maqueda, 2004).

AS-48 es una sustancia de origen proteico que es termo estable. Es activa a temperaturas por arriba de los 80°C o por debajo de la temperatura de refrigeración, también es activa en un amplio rango de pH desde 3 hasta 8. AS-48 es un péptido que consta de 70 amino ácidos y tiene una masa de 7,149 Da, representa el primer ejemplo de una bacteriocina cíclica descrita en la literatura, su estructura está compuesta por  $\alpha$ -hélices (Figura 8). Ha sido incluida en la clase IId de bacteriocinas no-lantibioticas circulares (Maqueda, 2004).

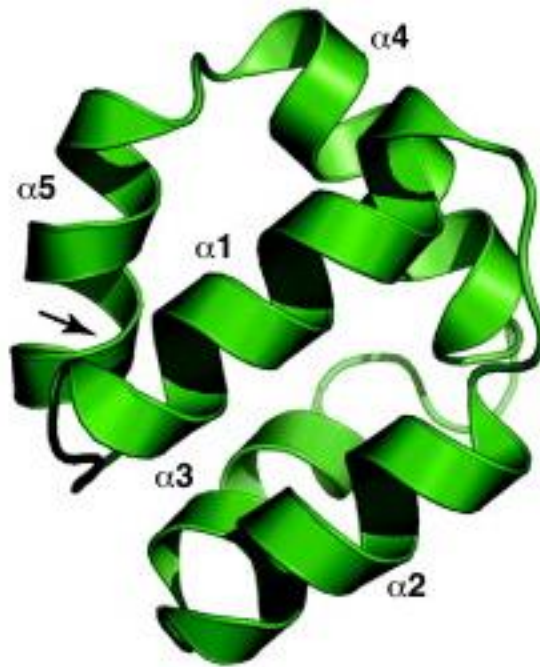


Figura 8. Estructura tridimensional de la enterocina AS-48 con  $\alpha$ -hélices (Van Belkum, *et al.*, 2004)

### Espectro de inhibición y modo de acción

El espectro de inhibición de AS-48 es notablemente amplio, siendo altamente activa contra la mayoría de las bacterias gram positivas y contra algunas gram negativas. Una concentración baja (3-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de enterocina ejerció una rápida actividad bactericida seguida de una gradual bacteriólisis contra varias especies de los géneros *Bacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* y en algunas especies de *Corynebacterium*. Las especies del género *Clostridium* fueron también inhibidas por AS-48, pero *L. monocytogenes* fue la bacteria más sensible, con una concentración mínima inhibitoria de 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 37°C. AS-48 también inhibe algunos microorganismos gram negativos pero en concentraciones mucho más altas, dentro de estos se incluye *Myxococcus*, *Rhizobium*, *E.coli*, *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* (Maqueda, 2004).

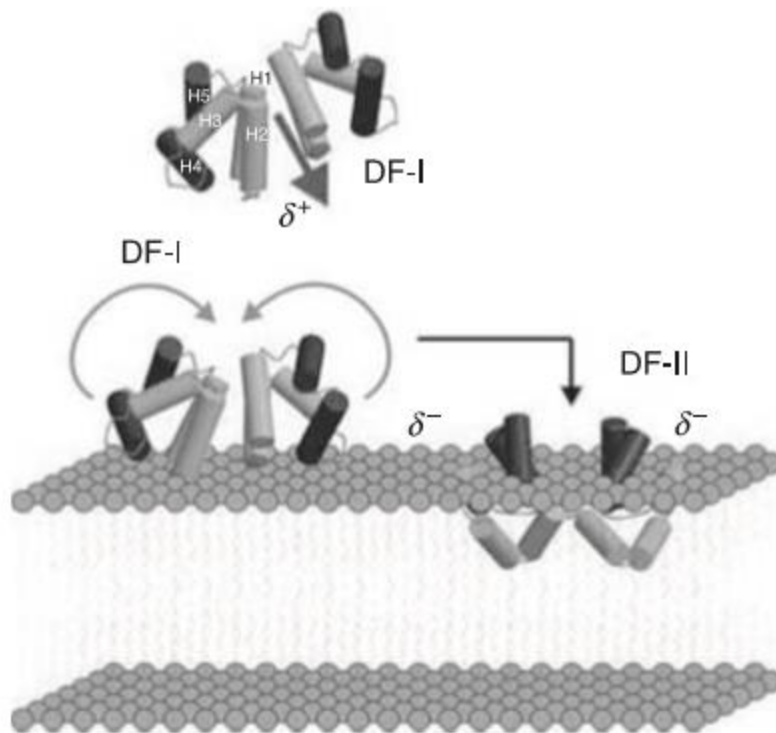


Figura 9. Representación esquemática del mecanismo de acción de AS-48. El modelo muestra el acercamiento de DF-I (Forma Dimérica I) a la membrana y la transición de DF-I a DF-II (Forma Dimérica II) en la superficie de la membrana. Las hélices hidrofóbicas y polares están representadas en gris y negro respectivamente. La flecha representa la dirección del momento dipolar intrínseco de DF-I. (Khan *et al.*, 2010)

Durante un estudio cristalográfico la forma en la que se encontró la enterocina fue en un dímero, por lo que se ha propuesto que la acción de AS-48 no depende del potencial de membrana pero implica una inserción efectiva dentro de la membrana que causa una reorganización estructural de la forma dimérica hidrosoluble en la superficie de la membrana (Figura 9). Se sugiere que el momento dipolar del dímero en solución direcciona a éste a la membrana. El pH bajo en la interfase de la membrana provocaría la desestabilización del dímero mediante la protonación de las cadenas laterales de glutámico. La transición del dímero soluble al dímero unido a la membrana permitiría a las moléculas de AS-48 insertarse ellas mismas en la membrana bacteriana vía la acumulación de cargas positivas en la superficie de la membrana que desestabilizaría el potencial de membrana llevando a cabo la formación de poro (Maqueda *et al.*, 2004).



### **2.3.3 *Enterococcus faecalis* FAIR E-77 como cepa productora de agentes antimicrobianos**

Los enterococos son cocos gram positivo, catalasa negativo, no formadoras de esporas, anaerobios facultativos, usualmente se encuentran en el tracto gastrointestinal de humanos, adicionalmente se han podido aislar de diferentes fuentes animales y debido a su capacidad de sobrevivir ante diversas condiciones como lo son: altas concentraciones de NaCl (toleran hasta 6.5%), amplio rango de temperatura (10-45°C) y pH (4.5-10.0), pueden colonizar un amplio rango de nichos (Fisher & Phillips, 2009).

*Enterococcus* es uno de los géneros pertenecientes a las bacterias ácido lácticas, son capaces de inhibir un gran número de microorganismos patógenos debido a varios productos finales de la fermentación que pueden llegar a generarse dependiendo de las condiciones de crecimiento. Destacan por su actividad inhibitoria: los ácidos láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (Shirai, 1996).

Respecto a su uso biotecnológico en la industria alimentaria, participan en la fermentación natural de diversos alimentos como en queso, salchichas y aceitunas. El género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, con *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* como las especies más frecuentemente encontradas en alimentos (Giraffa, 2003).

La cepa utilizada en este proyecto como productora de compuestos antimicrobianos, *Enterococcus faecalis* FAIR E-77, pertenece a la BCCM (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, por sus siglas en inglés; número de acceso LMG 20681) y fue aislada de queso de cabra con origen geográfico en Italia, se recomiendan como condiciones de crecimiento su incubación a 37 °C y en condiciones de microaerobiosis. La principal razón por la cual se empleó dicha cepa fue debido a su capacidad lítica contra bacterias patógenas, dicha actividad se asocia principalmente a la producción de la enterocina AS-48 (<http://bccm.belspo.be>).

### **2.4 Incorporación de agentes antimicrobianos en envases bioactivos**

La razón por la cual se incorporan antimicrobianos al envase es básicamente para prevenir el crecimiento de microorganismos en la superficie de alimentos. Por ejemplo, la carne intacta proveniente de los animales inicialmente es estéril, pero durante su manejo se contamina principalmente en la superficie. La liberación gradual del agente antimicrobiano a la superficie del alimento tiene una ventaja sobre el uso de sprays y baños sumergidos. La ventaja radica en que las películas con bajo índice de difusión

mantienen altas concentraciones del agente antimicrobiano en la superficie por un mayor lapso.

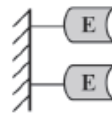
Una de las formas para mantener los compuestos activos en el envase, sobre todo cuando se trata de películas es la inmovilización, ya que con esta se retienen los compuestos activos y se puede presentar una liberación gradual de los mismos hacia el alimento.

### 2.4.1 Inmovilización

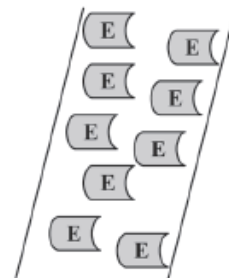
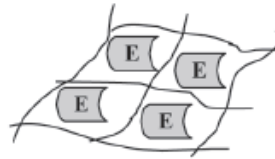
Las enzimas pueden catalizar reacciones en diferentes estados: como moléculas individuales, en solución, en agregados con otras entidades y unidas a alguna superficie. La unión o inmovilización ha sido de gran interés para la industria biotecnológica.

Existen diferentes tipos de técnicas de inmovilización, las cuales se pueden clasificar en dos grupos: métodos reversibles e irreversibles. El concepto de inmovilización irreversible significa que una vez que el biocatalizador ha sido unido al soporte, el biocatalizador no puede ser separado sin perder la actividad biológica del soporte o destruir el soporte.

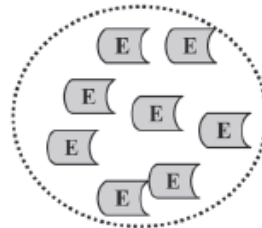
❖ **Unión covalente**



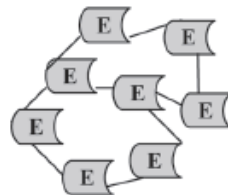
❖ **Atrapamiento**



❖ **Microencapsulación**



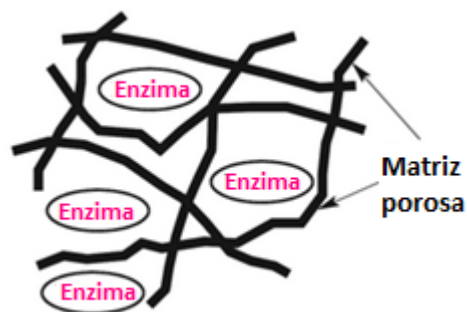
❖ **Entrecruzamiento**



Los métodos más comunes de inmovilización irreversible son: unión covalente, atrapamiento, micro-encapsulación y entrecruzamiento (Brena, 2006).

Considerando que los compuestos a inmovilizar son una mezcla de compuestos extracelulares cuya naturaleza hidrofóbica se desconocía y tomando en cuenta la formación de una biopelícula, se optó por la inmovilización mediante atrapamiento.

El atrapamiento consiste en la retención de la enzima en cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida por prepolímeros entrecruzables o biopolímeros. El sustrato y los productos pueden atravesar la red polimérica pero se retiene la enzima. En este método de inmovilización la enzima no se encuentra unida a la membrana o matriz. (Figura 10).



*Figura 10. Representación esquemática de la inmovilización mediante atrapamiento.*

Una vez que los agentes antimicrobianos han sido inmovilizados en la matriz se obtiene la biopelícula con actividad antimicrobiana, la cual debe ser sometida a ciertas pruebas de efectividad con el fin de saber si posee o no las cualidades necesarias para ser un envase funcional.

## **2.5 Pruebas de efectividad de los envases antimicrobianos**

Actualmente existe una variedad de métodos de prueba oficiales para determinar la resistencia de materiales plásticos a la degradación microbiana, sin embargo, no existen métodos estándar para determinar la efectividad de polímeros antimicrobianos.

Las pruebas de difusión en agar son muy útiles, se basan en la colocación de la película antimicrobiana sobre un medio sólido de agar que contenga algún microorganismo indicador. Las cajas con agar son incubadas hasta que haya crecimiento visible, un halo

claro alrededor de la película indica la difusión del antimicrobiano y la subsecuente inhibición bacteriana. Deben colocarse controles apropiados para evitar falsos positivos debido simplemente a la falta de oxígeno. El método puede ser cuantitativo si el diámetro del halo puede medirse.

El envase de alimentos es altamente regulable alrededor del mundo. Los agentes antimicrobianos del envase activo que migren hacia el alimento son considerados como aditivos y por lo tanto deben de cumplir con los estándares ya establecidos para aditivos, es decir, debe presentarse evidencia suficiente para demostrar que es seguro para el uso en que pretende emplearse (Appendini P. y Hotchkiss J.H., 2002).

Adicionalmente, se deben realizar análisis sobre la funcionalidad del material de envase para demostrar su eficiencia y resistencia como tal.

### **Pruebas mecánicas**

Las pruebas mecánicas son pruebas destructivas en las que los materiales de estudio son sometidos a esfuerzos mediante la aplicación de una fuerza externa hasta su deformación y/o ruptura, para determinar sus propiedades de dureza, elasticidad, fragilidad y resistencia a la penetración. Se pueden estudiar materiales diversos como: polímeros, metales de baja dureza, materiales cerámicos y materiales compuestos.

El comportamiento mecánico de un material refleja la relación entre la fuerza aplicada y su respuesta, es decir, su deformación. El método más común para determinar las propiedades mecánicas de un material es controlar su deformación bajo la acción de una fuerza determinada (Martínez, 2014).

En la Figura 11 se puede ver una señal típica obtenida en un equipo de pruebas mecánicas (SINTECH 1/S) en la cual se observan los datos registrados de fuerza y tiempo que describen el comportamiento de una película sometida a penetración o extensión. En la zona de deformación elástica inicial se observa una relación proporcional entre el esfuerzo (fuerza/área) y la deformación, es decir, la película muestra un comportamiento elástico. Posteriormente se supera el punto límite de proporcionalidad, la película presenta aun elasticidad, pero la deformación no conserva la relación lineal, esto está señalado como el comportamiento durante la punción o extensión. Finalmente, el punto máximo corresponde a la ruptura inicial de la película y la caída en la fuerza debido a la ruptura subsecuente.

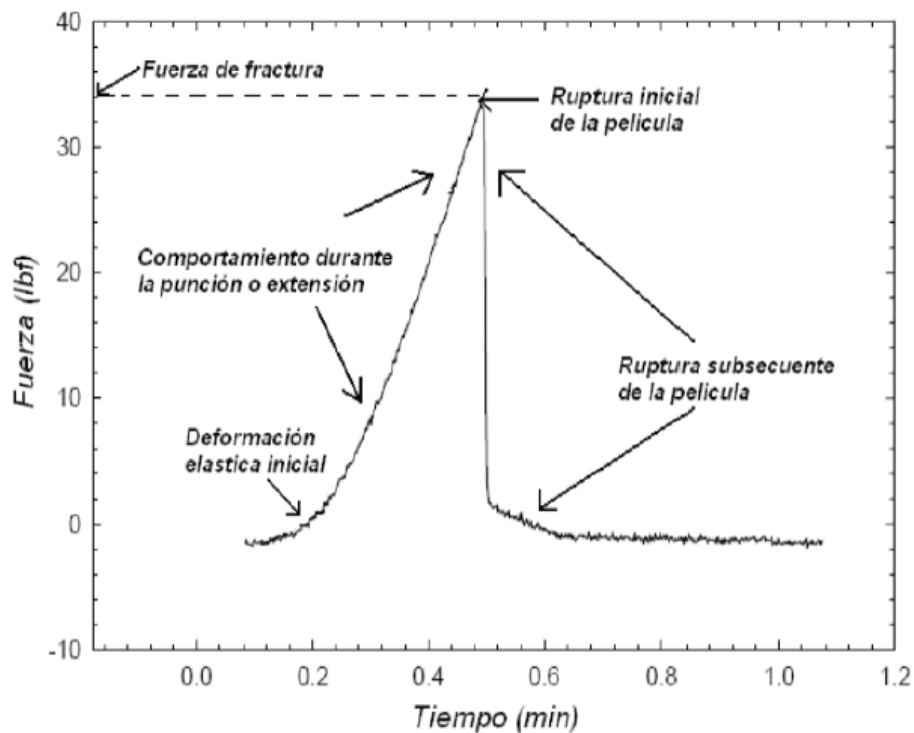


Figura 11. Esquema representativo de la señal típica obtenida en el equipo de pruebas SINTECH 1/S durante la punción o extensión de una película (Martínez, 2014)

### Pruebas de permeabilidad

La permeabilidad es el fenómeno físico-químico de transferencia de masa a través del envase. La permeabilidad de los films y envases es un factor crítico en la conservación de los productos envasados, sobre todo en el caso de los alimentos. El oxígeno y la humedad (vapor de agua) son dos de los factores principales de degradación para numerosos alimentos (Martínez, 2014).

### 3. Aplicaciones

Las aplicaciones de agentes antimicrobianos en envases y el número de investigaciones publicadas relacionadas con patentes de los mismos han incrementado durante los últimos años. Aditivos GRAS y antimicrobianos naturales han sido incorporados en diferentes matrices y han sido probados contra una variedad de microorganismos incluyendo *Listeria monocytogenes*, *E. coli* patogénica y hongos.

### 3.1 Productos cárnicos refrigerados

La carne y sus derivados son productos con alto contenido acuoso, pH cercano a la neutralidad y son también ricos en nutrientes, por consiguiente son susceptibles a la contaminación bacteriana. La contaminación bacteriana en carne es de gran preocupación, especialmente en la actualidad con los productos “listos para consumo” donde los microorganismos contaminan mayoritariamente la superficie de los alimentos. La contaminación no solamente causa descomposición de los productos, también hay desarrollo de brotes de infecciones transmitidas por alimentos y el subsecuente retiro del mercado del producto, lo cual conlleva a una enorme pérdida económica y aun grave problema de salud.

La carne cruda es considerada como la de mayor susceptibilidad al desarrollo microbiano. Durante la cadena de distribución de la carne se emplea temperatura baja (4°C) para preservarla, mientras que el congelamiento es empleado como una alternativa para la conservación prolongada cuando el tiempo de distribución es mayor. Aun cuando la carne se conserva en frío (4°C), el crecimiento de microorganismos psicrótrofos continúa.

### 3.2 Microorganismos patógenos y de descomposición

Dentro de los microorganismos encontrados en carne y sus derivados se encuentran: hongos, levaduras y bacterias, tanto de descomposición como patogénicos. El tipo de microorganismos presentes en la carne varía dependiendo de: el estado fisiológico del animal a la hora del sacrificio, la temperatura de almacenamiento, higiene durante el proceso, área expuesta, microorganismos competitivos, etc.

Los microorganismos comúnmente encontrados en carne fresca refrigerada son: *Arthrobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus* spp., *Moraxella* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., y *Pseudomonas* spp. Los géneros de *Pseudomonas* más comunes son: *P. fragi*, *P. lundensis*, y *P. fluorescens* (Ercolini *et al.*, 2009). Los patógenos predominantes en carne asociados a brotes de infecciones son: *E. coli* enterotoxigénica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, y *Campylobacter jejuni*. Los serotipos de *Salmonella* incluyen: S. Typhimurium, S. Anatum, S. Agona, S. Derby y S. Enteritidis. *Listeria monocytogenes* también es asociada a brotes provocados por ingesta de pavo, jamón, y roast beef, aunque la incidencia está disminuyendo. *Staphylococcus aureus* ha sido encontrada, particularmente en carne rebanada y carne molida, durante el proceso y manejo del producto como resultado de una mala higiene (D’Agostino, 2016).

Al poder reducir el crecimiento de microorganismos patógenos como los previamente descritos se conserva la disponibilidad de la carne fresca y de esta manera se evita el desperdicio de recursos. Con el fin de lograr este objetivo se propone el uso de los envases antimicrobianos, específicamente el uso de una película con compuestos antimicrobianos inmovilizados capaces de migrar al alimento y conservar la inocuidad de la carne.

#### 4. Justificación

Los brotes de infecciones transmitidas por alimentos conducen hacia una investigación con alternativas innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos y mantener calidad, frescura y seguridad alimentaria. Una opción es el uso de envases con propiedades antimicrobianas que podrían prolongar la vida de anaquel de los alimentos y reducir el riesgo de patógenos mediante la inhibición del crecimiento de microorganismos que puedan estar presentes en el producto.

#### 5. Hipótesis

Los compuestos antibacterianos extra celulares producidos por la cepa *E. faecalis* FAIR E-77 conservarán su actividad lítica tras ser inmovilizadas en una película.

#### 6. Objetivos

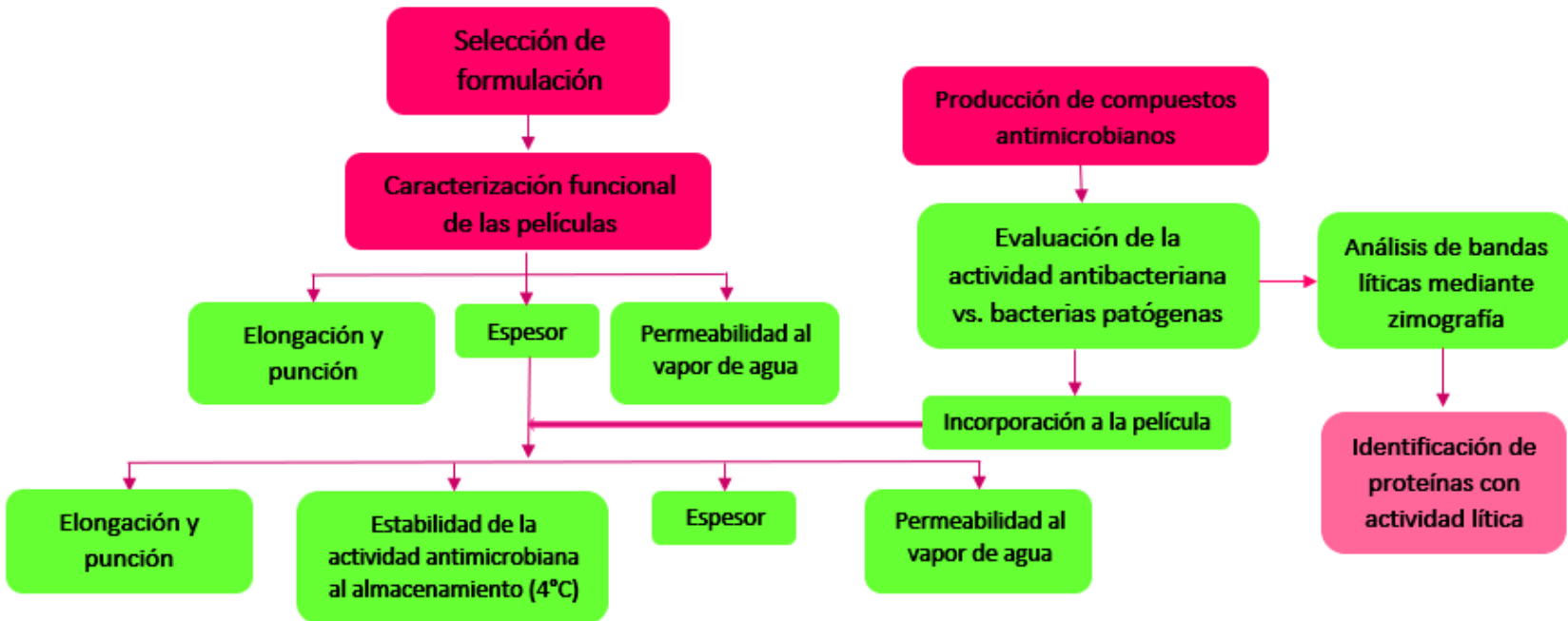
Objetivo principal

- Comprobar el efecto antimicrobiano, en condiciones de almacenamiento en refrigeración, de una película biodegradable mediante la incorporación de los compuestos antimicrobianos extracelulares producidos por *E. faecalis*.

Objetivos particulares:

- Desarrollar la formulación de una película en la cual se inmovilizarán las enzimas y/o péptidos antimicrobianos
- Producir los compuestos antimicrobianos por vía fermentativa
- Evaluar el efecto del proceso de inmovilización sobre la actividad antibacteriana
- Evaluar la estabilidad de la actividad antibacteriana bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración.





- **Formulaciones de películas de almidón**

Con base en diferentes artículos académicos relacionados con la elaboración de biopelículas a partir de almidón (Nascimento *et al.*, 2012; De Araújo G. *et al.*, 2015; Ghosh *et al.*, 2015), se eligieron tres diferentes formulaciones con el fin de poder obtener una película fácil de elaborar y de moldear, que además conservara características apropiadas para su fin.

Tabla 3. Formulaciones para la elaboración de las películas a base de almidón de maíz y papa.

	Almidón		
Condiciones	1	2	3
% Almidón (w/v)	5%	3%	4%
% Glicerol (w/w almidón)	0.3	0.2	0.4
Temperatura de mezclado (°C)	90	80	70
Tiempo de mezclado (min)	10	20	30

- **Elaboración de la película de almidón**

Las películas de almidón (almidón comercial de maíz y de papa, ambos de la Droguería Cosmopolita, números de catálogo 228 y 977) se elaboraron mediante la solubilización inicial del almidón (3-5% w/v) en agua destilada, generalmente considerando un volumen final de 100 mL. La solución de almidón se esterilizó mediante vapor en autoclave (121°C, 15 min). Una vez estéril, se esperó a que la temperatura de la mezcla disminuyera hasta obtener la temperatura indicada en la Tabla 6, en ese momento se adicionó el glicerol (0.2-0.4% w/w, dependiendo de la formulación; JT Baker Glicerol Anh. RA ACS. Modelo 2136-03), la temperatura indicada en la tabla 6 se mantuvo durante el tiempo de agitación indicado en la misma tabla para cada formulación.

Una vez que se había incorporado el glicerol a la solución de almidón, se esperó a que la mezcla disminuyera su temperatura a 60°C (temperatura a la cual la mezcla aun podía

verterse y con la cual se evitaba la posible desnaturalización proteica del concentrado) para poder verterla en cajas Petri de plástico. El diámetro de las cajas empleadas fue de 9.0 cm, en una caja se vertieron 6 g de mezcla, por lo que se puede considerar que la relación empleada fue de 9.43 g de mezcla por cada 100 cm<sup>2</sup> de área de película elaborada.

Para todas las películas, posterior a la elaboración se llevó a cabo el secado en estufa estática a 40 °C durante 20 h, seguido de una etapa de acondicionamiento en la cual las películas permanecían en un desecador con humedad relativa del 55% durante 24 h, cumplido este lapso se desprendían manualmente las películas de las cajas Petri.

#### ▪ Formulaciones de películas de alginato

Las formulaciones de prueba a base de alginato también se eligieron con base en artículos científico relacionados con biopelículas (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2007; Siragusa y Dickson 1992; Yener *et al.*, 2009). Las variables dentro de las diferentes formulaciones que se probaron fueron: porcentaje de alginato, porcentaje de glicerol, mg de CaCl<sub>2</sub>, temperatura y tiempo de preparación.

Tabla 4. Formulaciones para la elaboración de las películas a base de alginato.

Formulación	% Alginato (w/v)	Glicerol (g/g alginato)	CaCl <sub>2</sub> (mg/g alginato)	Temp y t de preparación
1	1	0.36	50	70°C, 30min
2	1.5	0.36	50	90°C, 10min
3		0.6		
4		0.83		

#### ▪ Elaboración de la película de alginato

Las películas de alginato se elaboraron mediante la inicial solubilización del alginato (1-1.5% w/v) en agua destilada, generalmente considerando un volumen final de 100 mL, posteriormente se adicionó CaCl<sub>2</sub>. Se incrementó la temperatura de la solución de alginato hasta alcanzar la temperatura de mezclado indicada en la tabla 4, en ese momento se incorporó el glicerol. Después del tiempo de mezclado, se esperó a que la temperatura de la mezcla disminuyera a 60°C para poder verterla en cajas Petri de plástico. El diámetro de las cajas empleadas fue de 9.0 cm, en una caja se vertieron 6 g de mezcla.

Todas las películas elaboradas con alginatos se secaron a temperatura ambiente dentro de las cajas Petri durante 22 horas, seguido de una etapa de acondicionamiento en la cual las películas permanecían en un desecador con humedad relativa del 55% durante 24 h, cumplido este lapso se desprendían manualmente las películas de las cajas Petri.

## Caracterización de la película

### ▪ Espesor

Para enzimas inmovilizadas en el envase, el espesor de la biopelícula puede influir en la migración de los compuestos activos hacia el producto alimenticio (Malhotra B., *et al.*, 2015).

Como un parámetro descriptivo de la biopelícula se midió su espesor con un micrómetro manual en cinco puntos aleatorios de la película en tres muestras diferentes, el promedio se utilizó para los cálculos de las propiedades mecánicas.

### ▪ Solubilidad en agua

Se determinó la solubilidad en agua de las biopelículas con el fin de observar si la película se mantenía íntegra o no y para poder conocer el porcentaje soluble al estar en contacto con un alimento acuoso, esto considerando que el objetivo de la biopelícula es que esté en contacto directo con carne.

Se registró el peso de una película de 6 cm de diámetro, la cual se introdujo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de agua destilada cuya temperatura era de 4 °C, se sumergió la película de 6 cm de diámetro y se mantuvo en agitación a 100 rpm durante 1 hora en refrigeración (T= 4 °C). Se pesó y registró el peso en gramos de un círculo de papel filtro Whatman (Filtro cualitativo grado 1), el cual fue utilizado para filtrar la solución. El papel filtro y el retenido se secaron a 60°C durante dos horas en estufa estática. La solubilidad se obtuvo mediante diferencia de peso.

### ▪ Elongación y Fuerza de tensión

Se midió la fuerza de fractura de penetración y la fuerza de fractura en tracción en una máquina de pruebas mecánicas (SINTECH 1/S, MTS, USA) utilizando una celda de carga de 100 N. La fuerza de fractura en penetración fue determinada con el método descrito por (Gontard *et al.*, 1993). Las películas previamente acondicionadas (desecador HR 54 %, durante 24 h) fueron cortadas en círculos de 8 cm de diámetro y fijadas entre un soporte

metálico. Posteriormente, las películas fueron penetradas de manera uniaxial con una punta cilíndrica de 1.3 cm de diámetro a una velocidad constante de 100 mm/min. Se registró la resistencia a la penetración de al menos cinco muestras para cada formulación. El tratamiento de datos se presenta en el Anexo 1.

Para determinar la fuerza de fractura en tracción las películas previamente acondicionadas se cortaron en listones de 8 cm de largo por 1 cm de ancho. Los listones fueron sujetos por mordazas con una separación inicial de 5 cm. La velocidad de tracción fue de 240 mm/min y se registró la resistencia al estiramiento. Se probaron al menos cinco muestras por formulación. El tratamiento de datos se encuentra en el Anexo 1.

- **Permeabilidad al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua se determinó con base en el método desecante de la técnica gravimétrica ASTM E96, 2003. Esta técnica permite obtener la permeabilidad a partir de la determinación del coeficiente de transmisión de vapor de agua, mediante el monitoreo del incremento en peso generado por la transferencia de humedad a través de la película. Las películas previamente acondicionadas y cortadas en forma circular fueron colocadas en celdas de prueba cuyas dimensiones son: de la tapa, diámetro interno 5.6 cm y diámetro externo 8.1 cm; de la caja, diámetro interno 5.6 cm y altura 3.7 cm (Vázquez-Gil, 2008). Las celdas se llenaron con cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ) secado a peso constante a 200 °C, con el fin de mantener una humedad relativa de 0%. El desecante se colocó dentro de las celdas dejando un espacio de aire de 1 cm sobre su superficie, medido con un Vernier. Las películas se sujetaron a la celda con un anillo y cuatro tornillos localizados simétricamente a su alrededor y selladas con una capa de silicón para mantener condiciones de hermeticidad. Una vez ensambladas la celda con la película, se determinó el peso inicial y posteriormente las celdas fueron colocadas en un desecador (54% HR, durante 48 h) para que la diferencia de presión parcial de vapor de agua existente en ambos lados de la película proporcionara la fuerza impulsora para el flujo de vapor a través de la misma. Las celdas fueron extraídas rápida y periódicamente del desecador para registrar la ganancia en peso en intervalos de 24 h. Se realizaron cinco réplicas de cada formulación. Los datos fueron tratados con las ecuaciones descritas en el Anexo 2.

## Obtención de los compuestos antimicrobianos

### ▪ Cinética de crecimiento de la cepa productora

Con el objetivo de comparar la producción de agentes antimicrobianos en dos diferentes medios de cultivo se realizó una cinética de crecimiento durante 12 horas con la misma cepa *E. faecalis* y en dos medios de prueba: MRS (MRS Broth, Oxoid, CM0359) y BHI (Bacto™ BHI, BD, Ref.237500).

Se reactivó la cepa que se encontraba conservada en congelación mediante un inóculo de 100 µL de la cepa en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo BHI previamente esterilizado. Se incubó a 37°C y con 250 rpm durante 12 h. A estas células reactivadas se les denominó preinoculo.

En un matraz de 500 mL se utilizó un volumen de trabajo de 175 mL de cada uno de los medios de prueba (MRS y BHI) y se inoculó con 3 mL del preinoculo. Los matraces se incubaron a 37°C, 250 rpm y se registró la densidad óptica a 600 nm cada 2 horas durante 12 horas en el lector de placas Epoch (BioTek Instruments).

Se seleccionaron tres tiempos para determinar la producción de compuestos antimicrobianos mediante difusión en agar, los cuales se identificaron como a, b y c; donde a: fase exponencial (2 horas de crecimiento); b: fase estacionaria (6 h) y c: fase estacionaria tardía (12 h).

Para su uso en las difusiones en agar el sobrenadante se separó mediante centrifugación a 10,000 g durante 15 min a 4°C. El pH se ajustó a 7 con NaOH (0.5 M) y el sobrenadante se filtró utilizando una membrana de 0.22 µm (Millipore, type GVWP).

### ▪ Difusión en agar del sobrenadante

Se vertieron 15 mL de agar TSA 1% ( BD Tryptic Soy Agar; la formulación se incluye en el Anexo 3) en una caja Petri y se dejó solidificar a 4 °C durante 15 min; después, se vertieron 10 mL de agar (0.8%) que contenían 10<sup>7</sup> UFC/mL de *S. aureus* ATCC 5638 (o bien del microorganismo patógeno en cuestión). Después de la solidificación, se hicieron pozos de 9 mm de diámetro en el agar con una punta estéril de 1000 µL, se agregaron en cada pozo 180 µL de cada uno de los sobrenadantes. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 h, a 37°C. La prueba es considerada positiva cuando el diámetro del halo de inhibición es mayor a 1 mm, y la relación del diámetro del halo/ proteína total se calculó para evaluar la actividad específica (mm/mg proteína).

- **Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína se determinó con el método de Bradford (Bradford, 1976), en cuyo protocolo se indica el uso del colorante Coomassie Brilliant Blue G250. Se basa en la conversión de la forma leuco del colorante (marrón-naranja) a una de color intensamente azul cuando los grupos aniónicos del colorante interaccionan con los grupos amino de las proteínas. Dicha reacción se mide por absorbancia a 595nm y también existe una relación lineal dentro de determinadas concentraciones de proteínas. Este método es sensible en un rango de 1 a 25 microgramos para un volumen de 1 mL.

Generalmente se utilizó la segunda dilución de la muestra o bien la dilución necesaria para poder cuantificar con este método, se utilizaron 160  $\mu$ L de la muestra diluida y se colocaron en una microplaca (Costar, Corning; USA) a la cual se le adicionaron 40  $\mu$ L de reactivo de Bradford (BioRad; USA), tras 5 minutos de incubación se realizó la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm en el lector de placas Epoch (BioTek Instruments).

- **Concentración del sobrenadante**

Con el fin de reducir el volumen en el cual se encontraban contenidos los compuestos antimicrobianos y poder agregarlos a la película sin que el volumen modificara la concentración de los otros componentes (glicerol y almidón), se optó por el método de liofilización. Se eligió liofilizar todo el sobrenadante para no descartar ni desnaturalizar ningún compuesto antimicrobiano.

Se llevó a cabo el crecimiento de la cepa productora *E. faecalis* en caldo BHI, el volumen inicial fue de 175 mL y se realizó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad. Las condiciones de incubación fueron 37°C y 250 rpm durante 12 h. Después del tiempo de incubación, las células se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 10,000 g durante 15 min a 4°C. Se continuó trabajando con el sobrenadante, al cual, se le realizó un ajuste de pH a 7 con NaOH. Para asegurar la ausencia de células bacterianas el sobrenadante se filtró utilizando una membrana de 0.22  $\mu$ m. El sobrenadante se congeló para su posterior liofilización (se congelaron 17.5 mL de sobrenadante en un tubo falcon de 50 mL). Posteriormente la muestra se resuspendió en un décimo de su volumen original en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.

Con el objetivo de obtener la mayor inhibición bacteriana se probó la producción de agentes antimicrobianos en medio MRS, las condiciones y el tratamiento del sobrenadante fueron exactamente las mismas que se utilizaron para el sobrenadante en medio BHI descrito en el párrafo anterior.

- **Difusión en agar del sobrenadante concentrado**

Se vertieron 15 mL de agar TSA 1% (Tryptic Soy Agar, cuya formulación se incluye en el Anexo 3) en una caja Petri y se dejó solidificar a 4 °C durante 15 min; después, se vertieron 10 mL de agar (0.8%) que contenían 10<sup>7</sup> UFC/mL de *S. aureus* ATCC 5638 (o bien del microorganismo patógeno en cuestión). Después de la solidificación, se hicieron pozos de 9 mm de diámetro en el agar, e agregaron en cada pozo 180 µL del concentrado proteico. Las cajas de Petri se incubaron durante 24 h, a 37°C. La prueba es considerada positiva cuando el diámetro del halo de inhibición es mayor a 1 mm, y la relación del diámetro del halo/ proteína total es calculada para evaluar la actividad específica (mm/mg proteína).

Se utilizó como control negativo el medio (BHI o MRS) con el mismo tratamiento que la muestra y como control positivo nisaplin 10 mg/mL para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica*. Para *S. Typhimurium* se utilizó ampicilina 50 mg/mL. La procedencia de las cepas utilizadas en este trabajo de investigación se muestra a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Procedencia de las cepas

Microorganismo	Procedencia
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Posgrado FESC-UNAM
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	Ceparío FQ, UNAM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ceparío FQ, UNAM
<i>Y. enterocolitica</i>	Ceparío FQ, UNAM
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Ceparío FQ, UNAM

- **Elaboración de la película con actividad antibacteriana**

Como inicial consideración se optó por utilizar como agentes antibacterianos a los producidos por *E. faecalis* en caldo BHI, el concentrado proteico fue obtenido bajo las mismas condiciones anteriormente descritas en la página 32.



Las películas de almidón se elaboraron mediante la inicial solubilización del almidón (6 % w/v) en agua destilada, generalmente considerando un volumen final de 50 mL. La solución de almidón se esterilizó mediante vapor en autoclave (121°C, 15 min). Una vez estéril, se esperó a que la temperatura de la mezcla disminuyera hasta 90 °C, en ese momento se adicionó el glicerol (0.4 g glicerol/g almidón) y se mantuvo en agitación a 100 rpm. Para la adición del concentrado proteico se esperó a que la temperatura disminuyera hasta 60 °C. Se empleó una relación promedio de 117 µg de proteína por 1 gramo de mezcla (almidón + glicerol). Se adicionó el concentrado proteico y se mantuvo en agitación durante 5 minutos, posteriormente se vertió la mezcla directamente en cajas Petri. El diámetro de las cajas empleadas fue de 3.7 cm, en una caja se vertió 1 g de mezcla final, por lo que se puede considerar que en general se ocupó 1 g de mezcla final (almidón + glicerol + concentrado proteico) por cada 10.72 cm<sup>2</sup>. El secado se realizó en estufa a 40 °C durante 20 h. Al término del tiempo de secado, las películas se acondicionaron en un desecador con 54% de humedad relativa durante 24 h.

- **Difusión en agar (de la película)**

Se vertieron 15 mL de agar TSA (1%) en una caja Petri y se dejó solidificar a 4 °C durante 15 min; después se vertieron 10 mL de agar (0.8%) que contenían 10<sup>7</sup> CFU/mL de *S. aureus* ATCC 5638 (o bien del microorganismo patógeno en cuestión). Después de la solidificación, se colocó una cuarta parte de la película antibacteriana directamente sobre la superficie de agar, la película antibacteriana se colocó por duplicado (dos muestras de lotes independientes), las cajas Petri se incubaron durante 24h, a 37°C.

- **Estabilidad de la actividad antibacteriana al almacenamiento**

Las películas antibacterianas dentro del desecador (54% de humedad relativa) se almacenaron en el refrigerador para evaluar el efecto del almacenamiento durante 7 días a 4 °C. Se realizaron pruebas de difusión en agar tomando una cuarta parte de las películas, cada muestreo se realizó diariamente durante 7 días.

- **Actividad antibacteriana**

En matraces de 50 mL con un volumen de trabajo de 10 mL de medio BHI se ajustó la D.O. inicial del microorganismo patógeno a 0.001 para realizar cinéticas de crecimiento y se tomó una muestra de 200 µL para registrar la D.O a 600 nm en una microplaca (Costar, Corning; USA) en el equipo Epoch cada hora durante 10 horas. Los matraces se incubaron a 29 °C y 100 rpm.

Para observar el efecto del concentrado antimicrobiano líquido se seleccionó un microorganismo de prueba, en este caso *P. aeruginosa*, bajo los mismos criterios descritos

anteriormente, se adicionaron 670 µg de proteína del concentrado antibacteriano al inicio de la fase exponencial y como blanco se adicionó 1 mL del medio BHI (lío-filizado y resuspendido en buffer de fosfatos 100 mM pH 7 en una décima parte de su volumen inicial).

Con el fin de observar el efecto de los compuestos antibacterianos inmovilizados en la película, se realizó una cinética de crecimiento de la misma manera anteriormente descrita, al inicio de la fase exponencial se adicionó una película con compuestos antimicrobianos (área 10 cm<sup>2</sup>) y como blanco se utilizó una película de almidón sin concentrado proteico.

#### ▪ **SDS – PAGE**

Con el fin de observar el perfil proteico se prepararon geles de poliacrilamida al 14 % en condiciones desnaturizantes. Para la preparación de los geles se utilizó agua desionizada, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (gel separador), 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (gel concentrador), 30% bis-acrilamida, 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 10% APS y TEMED. En cada carril se cargaron 30 µL de la muestra (25 µg de proteína) y 5 µL de amortiguador de carga (agua desionizada, 50 mM Tris-HCl, Ph 6.8, 2.5% glicerol, 10% SDS y 0.5% azul de bromofenol y 0.2 M 2-mercaptoetanol). Las muestras fueron calentadas a ebullición durante 5 minutos antes de ser cargadas en el gel. Se utilizó el marcador de bajo peso molecular (Low Range, BioRad). Se llevó a cabo la electroforesis en la cámara de electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN®II (BioRad; USA) utilizando amortiguador de corrida (12 mM Tris-HCl, 186 mM glicina y 1% SDS). La fuente de poder se utilizó a 90 V durante 3 h a 4 °C.

Posterior a la electroforesis, el gel se enjuagó dos veces con 100 ml de agua desionizada durante 5 min a 60 rpm (Mini-orbital shaker TSSM1). El gel se tiñó con solución de Coomassie Blue G-250 (BioRad) (0.1% Coomassie G-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial, 45% v/v agua desionizada) durante 12- 16 h en agitación orbital a 60 rpm. Para revelar el perfil proteico, después del tiempo de tinción se utilizó una solución desteñidora (10 % ácido acético glacial y 10 % metanol).

#### ▪ **Zimogramas**

Se realizó SDS-PAGE renaturalizante preparando geles separadores de poliacrilamida al 14% tal como se describe en el punto anterior y añadiendo células del microorganismo prueba al gel (las células adicionadas eran las contenidas en 10 mL del medio de cultivo con D.O. de 0.8 a 600 nm y esterilizadas por calor húmedo 121 °C, 15 min). Después de la electroforesis los geles fueron lavados con agua desionizada con agitación suave durante 30 minutos y posteriormente fueron incubados a 37 °C con buffer renaturalizante (Tritón 1% v/v, buffer de fosfatos 50 Mm pH 7) durante 12-16 h y agitación constante a 50 rpm.

Los geles se tiñeron con solución de azul de metileno (0.1% m/v azul de metileno, 0.01% m/v KOH) durante 30 min y desteñidos con lavados constantes de agua destilada. El peso molecular fue determinado utilizando el marcador de bajo peso molecular (Low Range, BioRad).

## 8. Resultados y análisis

### 8.1 Elección de formulación para la biopelícula

Para poder elegir las formulaciones destinadas a su caracterización mecánica, se realizó inicialmente una selección cualitativa con base en la facilidad de desprender la biopelícula completa sin que ésta se fracturara, la película fue seleccionada para la prueba de solubilidad si se desprendía íntegramente, las formulaciones que generaron una película quebradiza quedaron inicialmente descartadas para pruebas posteriores. Estos resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Selección cualitativa de las diferentes formulaciones.

Formulación	Película desprendible íntegramente
<b>Almidón de maíz 1</b>	<b>Sí</b>
Almidón de maíz 2	No
<b>Almidón de maíz 3</b>	<b>Sí</b>
<b>Almidón de papa 1</b>	<b>Sí</b>
Almidón de papa 2	No
Almidón de papa 3	No
Alginato 1	No
Alginato 2	No
Alginato 3	No
<b>Alginato 4</b>	<b>Sí</b>

De las 6 formulaciones de almidón se seleccionaron tres, ya que las restantes se rompían al desmoldarlas. Respecto a las películas de alginato, la formulación 4 se desprendía fácil y completamente. Por lo tanto, después del primer criterio cualitativo se seleccionaron 4 formulaciones:

- Almidón de maíz 1 (AM1) [ almidón 5% (w/v) y 0.3 (w/w glicerol)]
- Almidón de maíz 3 (AM3) [almidón 4% (w/v) y 0.4 (w/w glicerol)]
- Almidón de papa 1 (AP1) [ almidón 5% (w/v) y 0.3 (w/w glicerol)]
- Alginato 4 (Alginato) [alginato 1.5% (w/v) y 0.83 (w/w glicerol)]

- **Porcentaje de solubilidad**

Como segundo criterio de selección se realizó la prueba de solubilidad, en la cual también se esperaba mantener la integridad de la película después de la inmersión en agua.

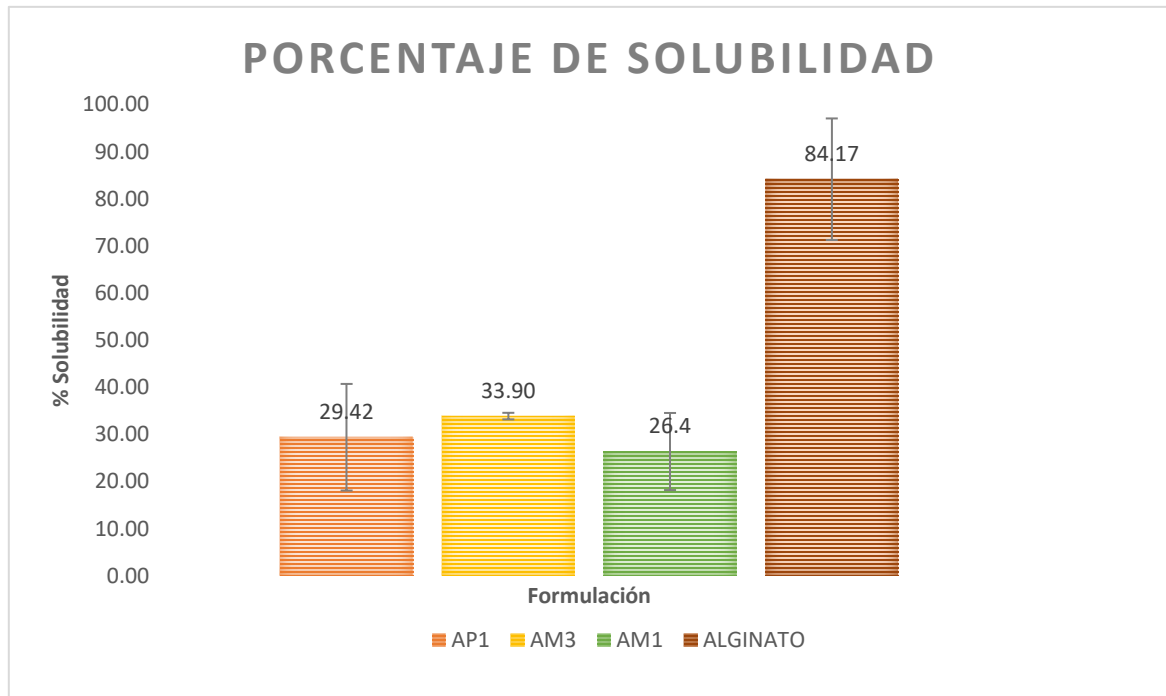


Figura 12. Porcentaje de solubilidad de las películas AP1 (almidón de papa formulación 1), AM3 (almidón de maíz formulación 3), AM1 (almidón de maíz formulación 1) y Alginato 4. Porcentaje de solubilidad calculado como diferencia de peso de la película después de una hora de inmersión en agua destilada a 4°C.

Puede observarse en la Figura 12 que, de las tres formulaciones de almidón, la AP1 muestra una mayor variabilidad respecto a su solubilidad, sin embargo, el porcentaje de solubilidad es muy cercano entre estas formulaciones. Se observó que el menor porcentaje de solubilidad fue el de la formulación AM1. La formulación de alginato presentó un alto porcentaje de solubilidad y la película se desintegró durante la prueba, razón por la cual quedó descartada como base para inmovilización de los compuestos antibacterianos. Las pruebas mecánicas posteriores se realizaron a las formulaciones: AP1, AM1 y AM3.

La solubilidad de la película es importante debido a que es deseable que haya difusión de las enzimas hacia el alimento, sin embargo, considerando que la carne tiene un alto  $a_w$

(>0.95) es preferible que la película no sea tan soluble de manera que no se desintegre al estar en contacto con la carne.

Para la determinación del espesor, fuerza de fractura en penetración, fuerza de fractura en tracción y permeabilidad al vapor de agua se utilizó como referencia la película autoadherente Kleen Pack.

- **Espesor**

Pensando en la función antimicrobiana del envase, uno de los factores a considerar es el grosor, ya que este va a facilitar o dificultar la difusión repercutiendo en la actividad antibacteriana. Sin embargo, cabe destacar que no se realizaron pruebas de diferente grosor para una misma formulación, es decir, los resultados mostrados son los obtenidos con la menor cantidad de mezcla necesaria para cubrir el área del molde y generar una biopelícula continua.

Tabla 7. Espesor de las películas de almidón (se expresa el promedio y la desviación estándar en cm).

Formulación	Espesor (cm)
Referencia	0.0304±0.010
AM1	0.0728±0.010
AM3	0.0728±0.010
AP1	0.0796±0.024

El espesor promedio de las películas formadas es menor a un milímetro, considerando que son hechas de polisacáridos y no de plásticos (donde debido a la extrusión el espesor puede disminuir, como se observa con la referencia). Además de servir como parámetro descriptivo, la importancia de la determinación del espesor radica en su utilización para el cálculo de las siguientes características como lo es la permeabilidad al vapor de agua.

### 8.1.1 Pruebas mecánicas

- **Fuerza de fractura de penetración (Punción)**

Se observa en la Figura 13 que la formulación que requiere el mayor esfuerzo para poder fracturar la película al penetrar es la formulación de almidón 1, seguida de la de almidón de papa 1 y finalmente la de almidón de maíz 3. Es posible que ambas formulaciones 1 (AM1 y AP1) requieran un mayor esfuerzo debido a que contienen mayor cantidad de almidón, 1% más que la formulación AM3. Al comparar las formulaciones de prueba contra la referencia encontramos que el máximo porcentaje de similitud en cuanto a

esfuerzo en fractura en penetración lo presenta la película AM1 con 68% y la formulación AP1 apenas es la mitad de resistente que la referencia. Subrayamos en esta parte la diferencia de materiales entre la referencia y las formulaciones de almidón, no esperábamos igualar los valores, pero si era deseable alcanzar al menos el 75% de los mismos para que la biopelícula generada fuese funcional.

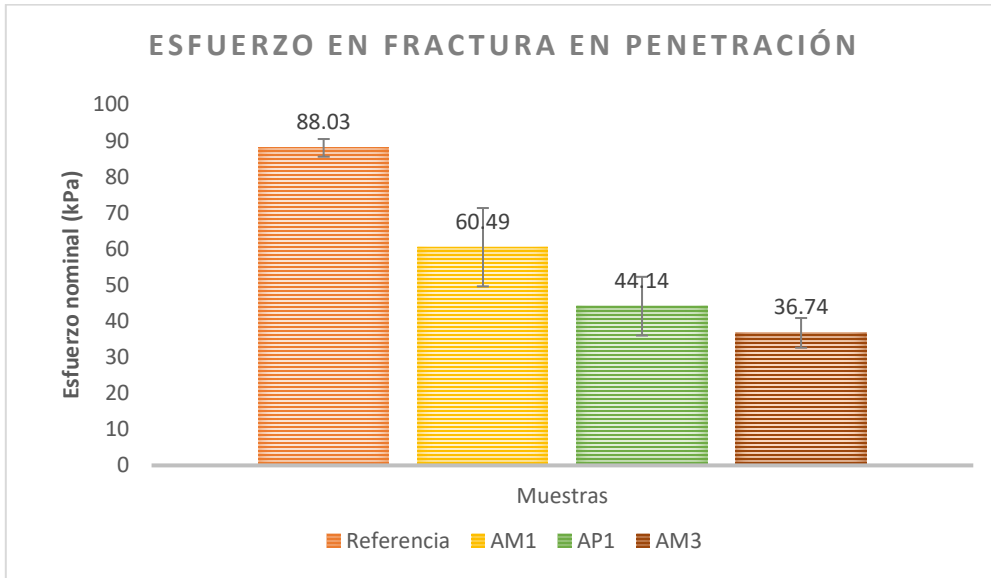


Figura 13. Esfuerzo en fractura en penetración de las películas.

- Fuerza de fractura en tracción (Elongación)

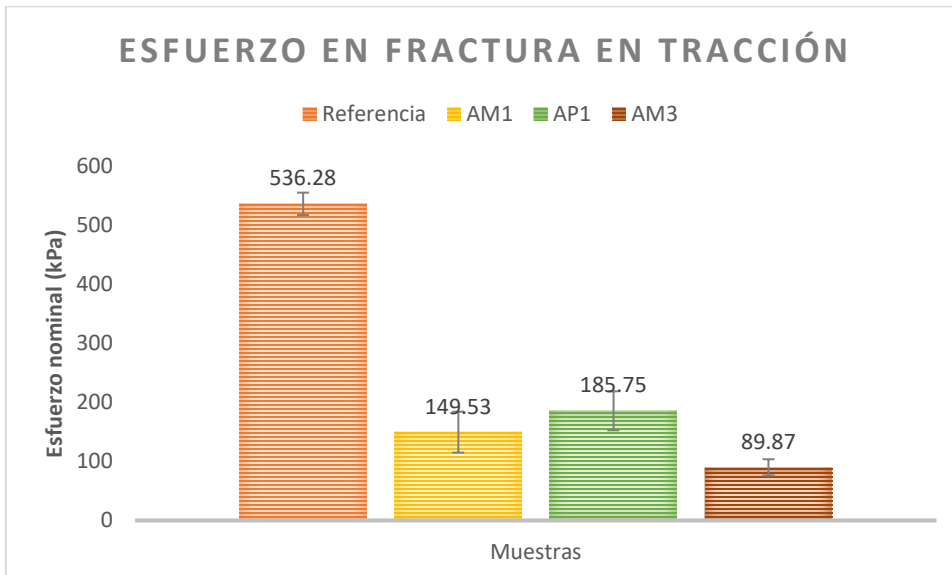


Figura 14. Esfuerzo en fractura en tracción de las películas.

El mayor esfuerzo nominal requerido en la elongación de las películas fue para las películas de papa, ya que estas resistieron durante un lapso más largo al realizar la elongación antes de su fractura, se esperaba que el almidón de maíz mostrara un mayor esfuerzo debido a su mayor contenido de amilosa, se observó de nuevo que el decremento en la concentración de almidón (formulación AM3) afectó la resistencia a la fractura. Al comparar las formulaciones de prueba contra la referencia encontramos que el máximo porcentaje de similitud en cuanto a esfuerzo en fractura en penetración lo presenta la película AP1 con 34% y la formulación AM1 presentó apenas poco más de un cuarto de resistencia a la extensión. Concluimos de esta parte que la propiedad mecánica de extensión de las formulaciones en prueba no es la mejor característica y sería deseable modificarla para poder aumentarla.

- Permeabilidad al vapor de agua

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua en unidades de (g/m h Pa), gramos registrados en el incremento de peso (agua) por área (el área de la película) por hora (tiempo de monitoreo) por Pa (relacionado con la diferencia de presión entre el ambiente desecante de la celda con humedad relativa de 0% y el desecador con humedad relativa de 54%).

Respecto a la permeabilidad se observa un orden de magnitud mayor al de la referencia, los valores son relativamente bajos. La formulación que presentó menor permeabilidad al vapor de agua fue la de maíz 3, sin embargo, las tres formulaciones presentan un valor en el mismo orden de magnitud.

*Tabla 8. Permeabilidad al vapor de agua promedio de las películas.*

Formulación	Permeabilidad (g/m h Pa)
Referencia	4.459 E-08 ± 3.7 E-09
AM1	1.805 E-07 ± 2.0 E-08
AM3	1.224 E-07 ± 1.2 E-09
AP1	1.516 E-07 ± 1.3 E-08

- Tabla comparativa para elección de biopelícula

Con base en las características evaluadas se elaboró la Tabla 9, la cual es una tabla comparativa para poder elegir la formulación con las mejores características. Para el porcentaje de solubilidad se buscó el más bajo con el fin de evitar la desintegración de la biopelícula; para las pruebas de extensión y punción los valores más altos expresaban una



mayor resistencia a la fractura; finalmente para el parámetro de permeabilidad el valor más bajo representaba un menor intercambio de vapor de agua entre el alimento y el medio a través de la biopelícula.

Tabla 9. Tabla de análisis de características de las películas para elección de formulación.

Formulación	Solubilidad (%)	Extensión $\sigma$ (kPa)	Punción $\sigma$ (kPa)	Permeabilidad al vapor de agua (g/m h Pa)
AM1	<b>26.38±8.18</b>	149.53 ±34.69	<b>60.49±10.86</b>	1.805 E-07 ± 2.0 E-08
AM3	33.90±0.69	89.87±13.78	36.74±4.12	<b>1.224 E-07 ± 1.2 E-09</b>
AP1	29.41±11.31	<b>185.75±33.00</b>	44.14±8.14	1.516 E-07 ± 1.3 E-08

La formulación que tuvo mejores características físicas fue la de almidón de maíz 1, contando con dos de cuatro características comparadas. Se consideró que esta formulación era la adecuada para la inmovilización de los compuestos antimicrobianos.

## 8.2 Producción del extracto con actividad antimicrobiana

### 8.2.1 Cinética de crecimiento del microorganismo productor

Inicialmente se registró el crecimiento del microorganismo en dos diferentes medios para poder identificar en cuál de éstos se producían más compuestos antibacterianos, los medios de prueba fueron MRS y BHI.

Se seleccionaron tres puntos de referencia para comparar la producción de compuestos antimicrobianos, los cuales se muestran en el gráfico con las letras: a, b y c; donde a: fase exponencial; b: fase estacionaria; c: fase estacionaria tardía.

Como puede observarse en la Figura 15, el crecimiento celular es similar en ambos medios, sin embargo, lo que nos interesaba era la producción de compuestos antimicrobianos. Se tomaron muestras de los sobrenadantes (sobrenadante libre de células y neutralizado) en los puntos A, B y C para evaluar su actividad mediante difusión en agar contra los siguientes microorganismos de prueba: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* y *S. Typhimurium*.

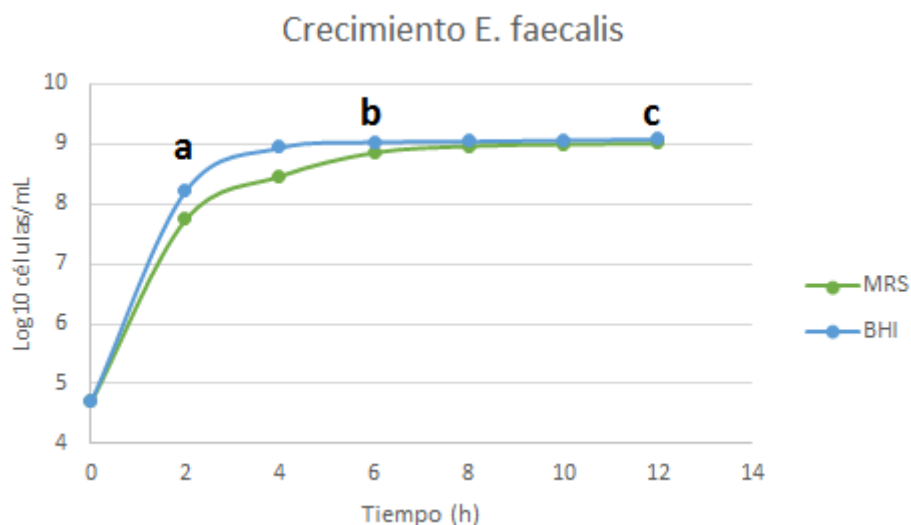


Figura 15. Crecimiento de *E. faecalis* en medios BHI y MRS. Se indican tres etapas de crecimiento bacteriano: a) fase exponencial; b) fase estacionaria y c) fase estacionaria tardía.

### 8.2.2 Halos de inhibición del sobrenadante

Con base en los resultados obtenidos en la Tabla 10, se observa que la mayor producción de compuestos antimicrobianos se obtiene en la fase estacionaria tardía (punto c) para ambos medios de cultivo. Como segunda consideración se tomó en cuenta que el sobrenadante debía concentrarse para su posterior inmovilización en la película, dentro de lo cual se buscaba que el concentrado aportara la menor coloración, por lo cual para los pasos posteriores se consideró continuar con el sobrenadante producido en el medio BHI.

Tabla 10. Relación de los mm del halo de inhibición (diámetro del halo) con respecto a los miligramos de proteína contenidos en el sobrenadante de prueba.

Microorganismo	MRS a mm halo / mg proteína	MRS b mm halo / mg proteína	MRS c mm halo / mg proteína	BHI a mm halo / mg proteína	BHI b mm halo / mg proteína	BHI c mm halo / mg proteína
<i>S. aureus</i>	45.73 ± 9.76	43.77 ± 7.93	61.27 ± 10.21	0	20.01 ± 7.50	51.98 ± 1.91
<i>L. monocytogenes</i>	50.59 ± 2.89	49.94 ± 16.66	68.03 ± 0.66	0	33.69 ± 6.05	58.31 ± 7.04
<i>P. aeruginosa</i>	30.35 ± 1.74	29.97 ± 9.99	47.67 ± 10.08	0	0	38.99 ± 1.44
<i>Y. enterocolitica</i>	45.73 ± 9.76	53.76 ± 11.26	61.27 ± 10.21	0	6.33 ± 8.94	38.99 ± 1.44
<i>S. Typhimurium</i>	30.35 ± 1.74	26.97 ± 5.75	40.82 ± 0.39	0	6.33 ± 8.94	32.32 ± 7.99

A modo ilustrativo se muestran a continuación las Figuras 16 y 17 en donde se observan los halos de inhibición generados contra la bacteria *S. aureus*

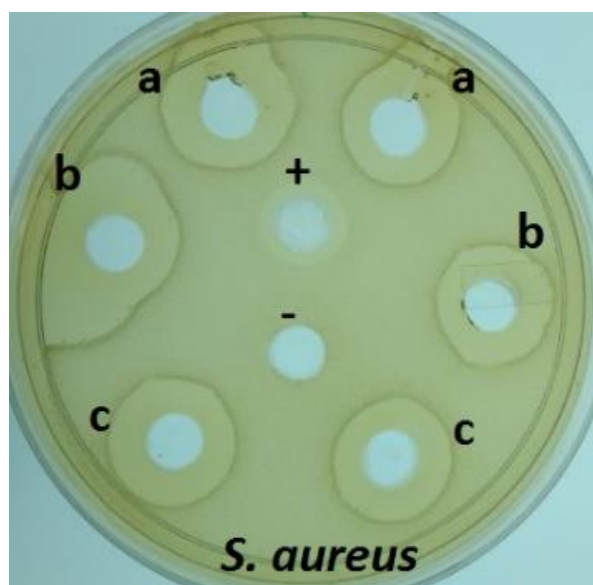


Figura 16. Halos de inhibición producidos por el sobrenadante de la cepa *E. faecalis* en medio MRS por duplicado. Se indican tres etapas de crecimiento bacteriano: a) fase exponencial; b) fase estacionaria y c) fase estacionaria tardía.

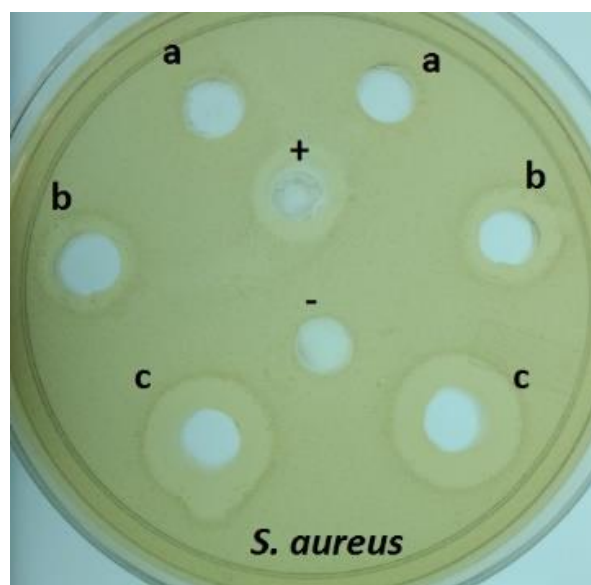


Figura 17. Halos de inhibición producidos por el sobrenadante de la cepa *E. faecalis* en medio BHI por duplicado. Se indican tres etapas de crecimiento bacteriano: a) fase exponencial; b) fase estacionaria y c) fase estacionaria tardía.

### 8.2.3 Halos de inhibición del liofilizado

Únicamente sabíamos con certeza que la cepa productora de agentes antimicrobianos producía la enterocina AS-48, sin embargo, no se descartó la posibilidad de la presencia de algún otro compuesto antimicrobiano. Aunado a esto, con el fin de obtener un extracto cuya concentración lograra inhibir el crecimiento bacteriano y cuyo volumen no modificara la concentración final de la mezcla de almidón con plastificante, se optó por liofilizar el sobrenadante, lo cual también contribuyó para conservar todos los compuestos presentes.

Se muestra en la Tabla 11 la relación de los mm del halo de inhibición (diámetro del halo) con respecto a los miligramos de proteína contenidos en el liofilizado (sobrenadante de la fase estacionaria tardía, neutralizado, liofilizado y resuspendido en un décimo de su volumen inicial en buffer de fosfatos pH 7).

En las cajas de difusión en agar hay un aumento en el diámetro del halo de inhibición si comparamos el halo del concentrado liofilizado contra el halo del sobrenadante, sin

embargo, el efecto de concentración es de proteína total y no específicamente de péptidos antimicrobianos.

Tabla 11. Relación de los mm del halo de inhibición (diámetro del halo) con respecto a los miligramos de proteína contenidos en el liofilizado resuspendido en buffer.

Microorganismo	Liofilizado resuspendido mm halo / mg proteína
<i>S. aureus</i>	45.73 ± 6.21
<i>L. monocytogenes</i>	49.86 ± 0.37
<i>P. aeruginosa</i>	49.86 ± 0.37
<i>Y. enterocolitica</i>	49.86 ± 0.37
<i>S. Typhimurium</i>	33.24 ± 0.24

A modo ilustrativo se muestra la Figura 18 en donde se observan los halos de inhibición (sobrenadante liofilizado y resuspendido) generados contra la bacteria *L. monocytogenes*. Se muestran en el Anexo 4 las fotos de los halos de inhibición contra las otras 4 cepas bacterianas.

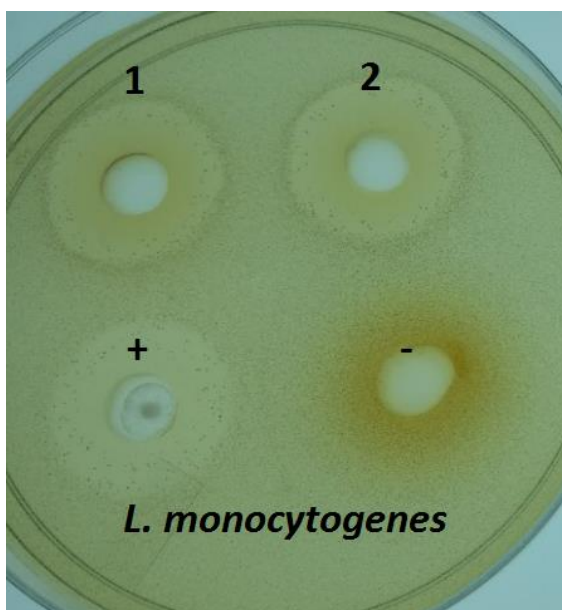


Figura 18. Halos de inhibición del liofilizado resuspendido contra la bacteria *L. monocytogenes*. Se indican con los números 1 y 2 las muestras por duplicado, + es el control positivo nisaplin 10 mg/mL y - corresponde al control negativo: medio BHI liofilizado y resuspendido en buffer de fosfatos pH 7.

Al observar los halos de inhibición producidos por el liofilizado resuspendido, se decidió trabajar con éste para su posterior inmovilización en la película ya que el volumen en el cual se encuentran contenidos los compuestos antimicrobianos permite su posterior inmovilización y sobre todo, se observa que hay actividad antimicrobiana contra los 5 microorganismos de prueba.

### 8.3 Pruebas a la película antimicrobiana

Para la elaboración de la película se consideraron las concentraciones iniciales de la formulación de almidón de maíz 1 [ almidón 5% (w/v) y 0.3 (w/w glicerol)], sin embargo, durante la incorporación de los compuestos antimicrobianos se encontraron dos problemas: el primero fue la disminución del porcentaje de almidón en la mezcla final debido a la adición del liofilizado resuspendido; y el segundo se expresó en una mayor fragilidad de las películas tras incorporar el concentrado proteínico. Debido a estos dos inconvenientes se aumentó la concentración de almidón inicial a 6 % para que el posterior volumen (del liofilizado resuspendido) ajustara la concentración a 5 % y por otra parte, también se aumentó la concentración de glicerol a 0.4 (w/w glicerol) con el fin de proporcionar mayor flexibilidad a la película. Para poder elaborar la película se consideraron los siguientes criterios:

- 20 mL de sobrenadante contienen la proteína necesaria para producir 104.8 cm<sup>2</sup>
- Promedio de proteína para inmovilizar 668 µg/mL
- Solución inicial 6% almidón

#### 8.3.1 Pruebas mecánicas

Los resultados de las pruebas de caracterización de la película ya con los agentes antimicrobianos incorporados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de la película con actividad antimicrobiana.

	Espesor (cm)	Solubilidad (%)	Extensión $\sigma$ (kPa)	Punción $\sigma$ (KPa)	Permeabilidad al vapor de agua (g/m s Pa)
<b>Película sin compuestos activos</b>	0.0728±0.010	26.38±8.18	149.53 ±34.69	60.49±10.86	1.805 E-07 ± 2.0 E-08
<b>Película con actividad antimicrobiana</b>	0.115± 0.02	65.76±4.61	223.12±6.82	68.86±7.73	9.06 E-09 ± 9.0 E-10

Deben tomarse en cuenta diferentes consideraciones en la elaboración y efectividad de un envase antimicrobiano, por ejemplo, la concentración de antimicrobiano en la película, el efecto del grosor de ésta en la actividad y las propiedades físicas y mecánicas de los polímeros finales. (Barros-Velazquez J., 2016).

Se observan en la Tabla 12 los valores de cada característica evaluada antes y después de la incorporación de los compuestos antibacterianos. El espesor aumenta cuando se ha incorporado el concentrado antimicrobiano, lo cual puede atribuirse al cambio en la composición de la mezcla tras la incorporación del concentrado proteico, es decir que las proteínas presentes modifican la viscosidad, sin embargo, lo que nos interesaba era que con ese espesor los productos antibacterianos pudiesen migrar al alimento para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, lo cual sí sucede y se muestra más adelante en las Figuras 19 y 20.

La solubilidad incrementa en las películas antimicrobianas, esto debido a que se adicionó un concentrado proteínico que puede interactuar y desestabilizar la matriz de los polisacáridos y el plastificante.

Finalmente, respecto a la permeabilidad al vapor de agua, se observó una disminución en dos órdenes de magnitud para la película activa, lo cual puede relacionarse directamente con el incremento del espesor, es decir, si la película aumenta su espesor esto genera una menor permeabilidad.

Respecto a las características físicas de la película podemos concluir que el desempeño obtenido tras la incorporación del concentrado antimicrobiano no es el mejor, la solubilidad aumentó exponiendo así a la película a la desintegración al estar en contacto con algún alimento, sobre todo con carne. La extensión y punción aun distan de los valores ideales si lo que se pretende es que la biopelícula cumpla la misma función autoadherente que la marca comercial kleen pack.

Respecto a la permeabilidad al vapor de agua, las películas de almidón con el concentrado proteínico inmovilizado permiten una menor permeabilidad, lo cual es deseable ya que esto favorece la conservación de los alimentos contenidos en el envase.

De las características evaluadas, el espesor, el esfuerzo nominal en penetración y la permeabilidad al vapor de agua son equiparables a los valores encontrados en literatura y resultan funcionales, sin embargo, sería deseable disminuir el porcentaje de solubilidad de las películas, así como también poder incrementar el esfuerzo nominal en extensión, ya que este sería un requisito indispensable debido a la aplicación a la cual está destinada la película.

### 8.3.2 Inhibición bacteriana con respecto al almacenamiento de la película

Continuando con la evaluación de las características de las películas activas, otra característica de suma importancia es la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Dicha actividad se evaluó durante 7 días ya que nos interesaba observar la retención de la actividad durante ese lapso en refrigeración. La actividad antibacteriana de la película se observó de manera cualitativa mediante pruebas de difusión en agar. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Inhibición antibacteriana debajo del área de la película con respecto al almacenamiento de la película.

Microorganismo	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
<i>S. aureus</i>	●●●	●	●	●	●	●	●	●
<i>L. monocytogenes</i>	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
<i>P. aeruginosa</i>	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
<i>Y. enterocolitica</i>	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
<i>S. Typhimurium</i>	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●

●●● Inhibición completa debajo del área de la película

●● Inhibición mayoritaria debajo del área de la película

● Poca inhibición debajo del área de la película

Se observa que al tiempo cero la actividad antimicrobiana de los compuestos inmovilizados es suficiente para eliminar el crecimiento por completo debajo del área de contacto para todos los microorganismos de prueba, incluyendo entre estos, bacterias Gram positivo y bacterias Gram negativo. Se observa que, al transcurrir el tiempo de almacenamiento de la película, la actividad permanece estable para cuatro de los cinco microorganismos, el único microorganismo contra el cual la actividad se ve disminuida desde el primer día de almacenamiento es *S. aureus*.

A modo ilustrativo se muestran a continuación las Figuras 19 y 20 donde se observa la actividad de las películas al tiempo cero y al tiempo final del almacenamiento (día 7).

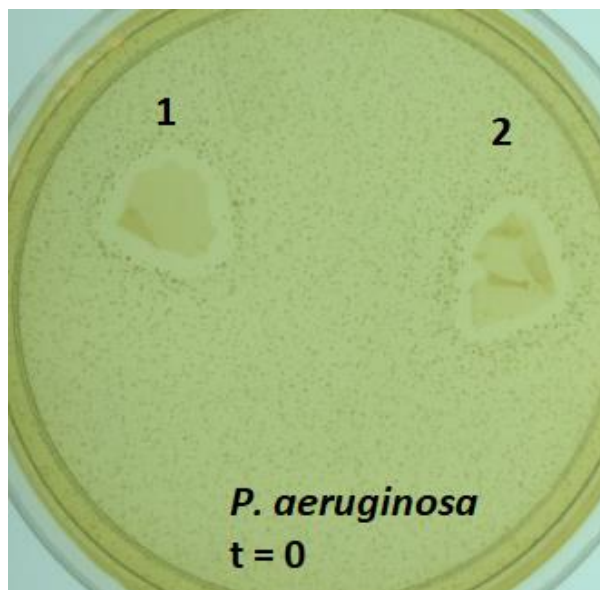


Figura 19. Difusión en agar de la película con actividad antimicrobiana al tiempo cero contra *P. aeruginosa*

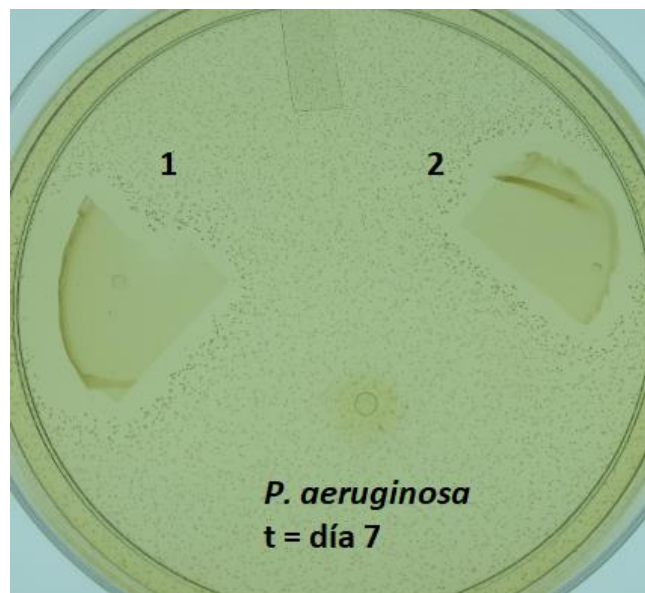


Figura 20. Difusión en agar de la película con actividad antimicrobiana después de 7 días de almacenamiento contra *P. aeruginosa*

En las figuras puede observarse el halo de inhibición de crecimiento debajo del área de las películas e incluso fuera del área de las mismas, lo cual indica que sí hay difusión de los compuestos antimicrobianos y que estos se mantienen con actividad lítica. Las Figuras 18 y 19 corresponden a la actividad contra *P. aeruginosa*, cabe destacar que la misma inhibición se presentó contra *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* y *S. Typhimurium*. Para el caso de *S. aureus*, como se indica en la Tabla 19, la actividad inhibitoria de la película contra este microorganismo disminuyó después de 24 h de almacenamiento de las películas. Las imágenes de las difusiones en agar restantes pueden verse en el Anexo 5.

Con el objetivo de observar la actividad antibacteriana se realizaron cinéticas de crecimiento del microorganismo *P. aeruginosa* en ausencia del concentrado antimicrobiano, con el agente antimicrobiano líquido y con las películas que contenían dicho concentrado directamente en contacto inmersas en el medio de cultivo. Los resultados se muestran a continuación en las Figuras 21 y 22.



### 8.3.3 Actividad antibacteriana en extracto e inmovilizada

Con el fin de observar la actividad antibacteriana de los compuestos inmovilizados, se monitoreó la densidad óptica (600 nm) de un cultivo de *Pseudomonas* en el cual se buscaba poder comparar el efecto de la adición del concentrado proteínico (liofilizado y resuspendido en buffer) contra el efecto de las películas que ya contenían el mismo concentrado en su formulación.

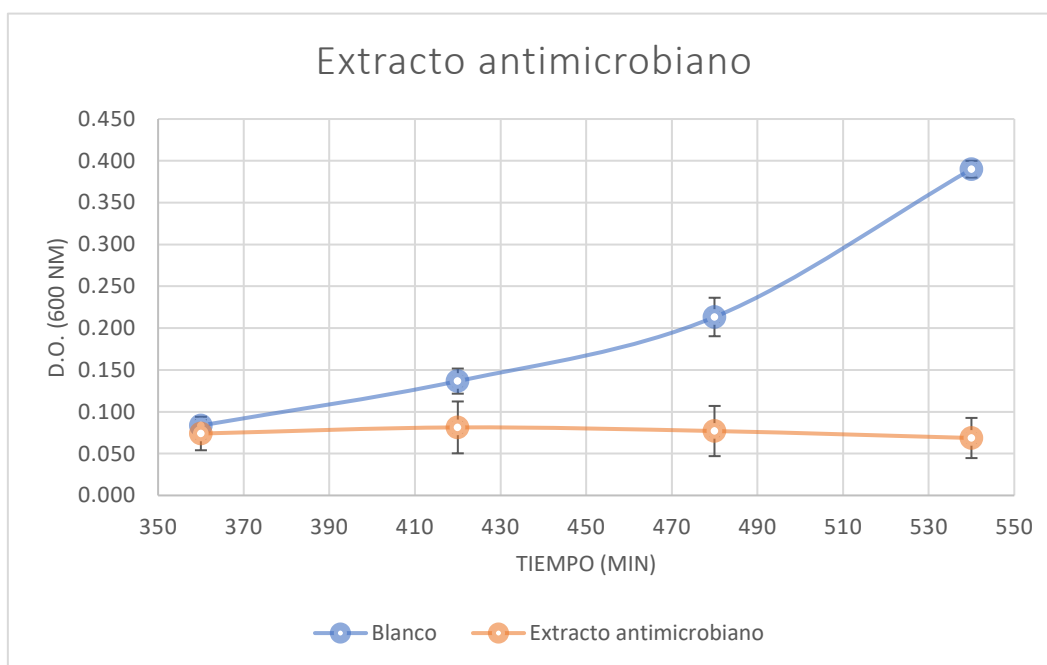


Figura 21. Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* y el efecto bacteriostático de la adición del extracto antimicrobiano. La adición del extracto antimicrobiano se realizó en el min 360 cuando ya había terminado la fase lag. Se utilizó como blanco medio BHI inoculado con *P. aeruginosa*.

En la figura 21 se observa el crecimiento de *P. aeruginosa* a partir del minuto 360, se muestra a partir de este minuto ya que es el punto en el que comenzó la fase logarítmica de crecimiento. Una vez que el microorganismo había superado la fase lag entonces se adicionó al medio de cultivo el extracto antimicrobiano liofilizado y resuspendido en bufer de fosfatos. Se observa el cambio en la pendiente cuando están presentes los compuestos antimicrobianos, es decir hay un efecto bacteriostático.

En la figura 22 se muestra la DO a 600 nm de la misma cepa *P. aeruginosa* y de igual manera se consideró el punto de inicio de la fase logarítmica, en esta ocasión se agregó al medio de cultivo una película con actividad antimicrobiana. Como resultado se observó una pendiente negativa al introducir la película al medio de cultivo, se conserva el efecto bacteriostático tanto en el concentrado en fase líquida como en la película.

La cantidad de proteína inmovilizada en la película es suficiente para causar el mismo efecto que el extracto proteínico en solución. Los compuestos se mantienen activos en la matriz, es decir, la red de almidón y la cantidad de plastificante agregada (glicerol) no interfieren con la actividad antibacteriana.

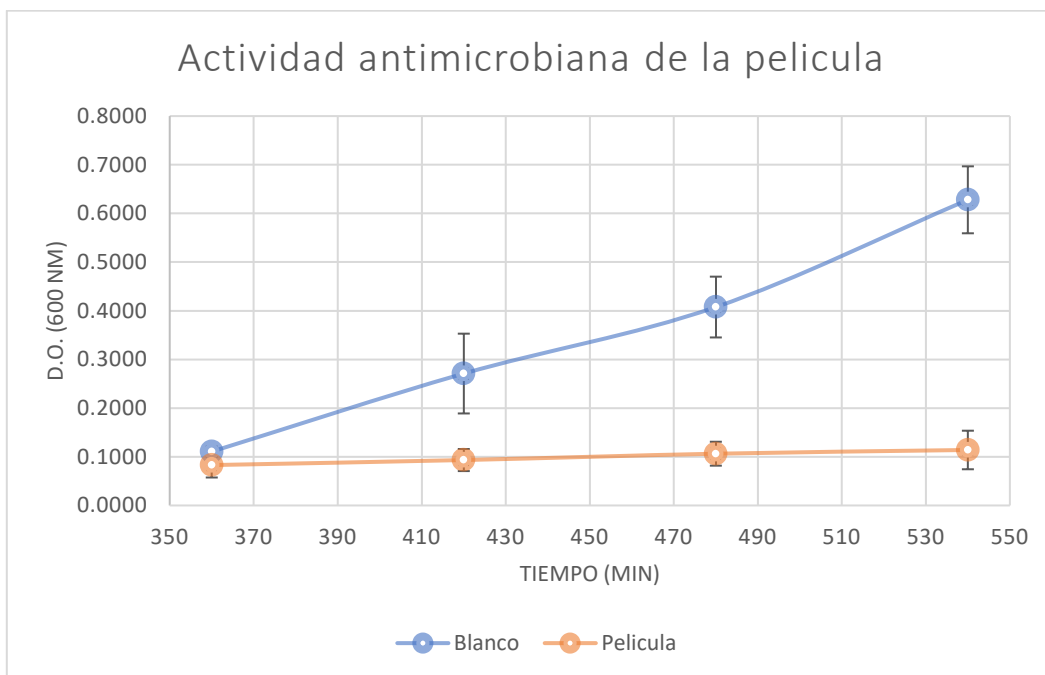


Figura 22. Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* y el efecto bacteriostático de la adición de la película antimicrobiana. La adición de la película se realizó en el min 360 cuando ya había terminado la fase lag. Se utilizó como blanco medio BHI inoculado con *P. aeruginosa* y con una película de almidón sin compuestos antimicrobianos.

## 8.4

### Identificación de proteínas con actividad bacteriolítica

Para la inicial elucidación de los compuestos antimicrobianos con actividad lo primero que se realizó fue un gel de electroforesis SDS-PAGE para observar el perfil proteico de la muestra concentrada, además se realizaron zimogramas para poder observar las bandas con actividad lítica. Se muestra a continuación una figura con el perfil de bandeado proteico y las bandas de lisis contra diferentes microorganismos.

#### 8.4.1 Zimogramas

Se observa en el perfil proteico una banda inferior a los 14 kDa cuyo peso y actividad lítica contra algunas bacterias como *L. monocytogenes*, *S. Tiphymurium*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica* indican la presencia de la bacteriocina AS-48. Por otra parte, se observan en la parte superior al menos dos bandas líticas contra la mayoría de las bacterias, debido a la

presencia de dichas bandas y a su actividad lítica, se consideró de importancia realizar una secuenciación de péptidos para poder identificar dichas proteínas.

Se seleccionaron tres bandas (32, 70, 95 kDa) con actividad lítica para su posterior análisis mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). Con las secuencias peptídicas obtenidas y mediante el algoritmo BLAST que se encuentra disponible en la página web del NCBI ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), considerando los criterios mencionados en cada recuadro en la parte de descripción se identificó cada proteína.

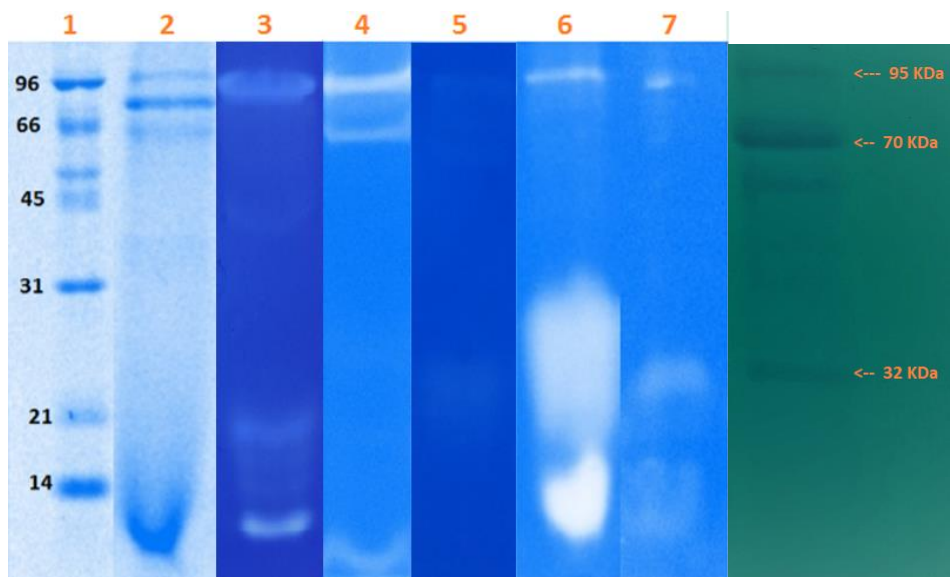


Figura 23. Perfil proteico y actividad lítica del liofilizado. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 perfil proteico teñido con azul de Coomassie; carriles 3, 4, 5, 6 y 7, Zimogramas contra *L. monocytogenes*, *S. tiphymurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica*, respectivamente. Al final se muestra el gel para secuenciación de péptidos en el cual se indican las tres bandas de interés. (SDS-PAGE 14%). Proteína total por pozo 25 µg.

Para todas las secuencias mostradas a continuación, se señala en color amarillo a los péptidos correspondientes a la muestra y a la proteína con la cual se identificó, en color verde se indican los aminoácidos y péptidos únicos.

### 8.4.2 Secuencias peptídicas

- ◆ Proteína de 32 kDa.

C7D0J4\_ENTFL (100%), 32,111.8 Da

Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase H OS=Enterococcus faecalis T2 GN=EFBG\_00027 PE=3 SV=1

15 exclusive unique peptides, 35 exclusive unique spectra, 711 total spectra, 174/292 amino acids (60% coverage)

M I L L V G G L L F	A L P A F E V Q A A	S T V T P K T V M Y	V E V N N H D F N N	V G K Y T L A G T N	Q P A F D M G I I F
A A N I N Y D T V N	K K P Y L Y L N E R	V Q Q T L N E A E T	Q I R P V Q A R G T	K V L L S I L G N H	E G A G F A N F P T
Y E S A D A F A A Q	L E Q V V N T Y H L	D G I D F D D E Y A	E Y G K N G T P Q P	N N S S F I W L L Q	A L R N R L G N D K
L I T F Y N I G P A	A A N S S A N P Q M	S S L I D Y A W N P	Y Y S T W N P P Q I	A G M P A S R L G A	S A V E V G V N Q N
L A A Q Y A K R T K	A E Q Y G I Y L M Y	N L P G K D S S A Y	I S A A T Q E L Y G	R K T N Y S P T V P	T P



Descripción: **Uncharacterized N-terminal domain of peptidoglycan hydrolase CwIO**  
[Function unknown]

Número de acceso EEN73198.1

Max score 173 Total score 173 Query cover 67% E value 1e-54 Ident 65%

**Job title: 70 kDa protein**

<b>RID</b> <a href="#">99NYNFA7014</a> (Expires on 02-28 11:00 am)	<b>Database Name</b> nr
<b>Query ID</b> Icd Query_136412	<b>Description</b> All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
<b>Description</b> 70 kDa protein	<b>Program</b> BLASTP 2.8.0+ <a href="#">Citation</a>
<b>Molecule type</b> amino acid	
<b>Query Length</b> 160	

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [Related Structures](#) [Multiple alignment](#) [MSA viewer](#)

**New** Analyze your query with [SmartBLAST](#)

**Graphic Summary**

[Show Conserved Domains](#)

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

The graphic shows a horizontal bar representing the query sequence from position 1 to 160. A yellow bar below it indicates a conserved domain labeled 'Cw101' spanning from approximately position 10 to 100. The text 'Query seq. Superfamilies' is on the left, and 'Cw101' is centered under the yellow bar.

La proteína de 70 kDa es una proteína cuyos péptidos corresponden a los anotados en la base de datos como “proteína no caracterizada de *Enterococcus faecalis*”, 160 aminoácidos de la secuencia muestra corresponden a los mismos de 463 de la proteína de *E. faecalis*, es decir, respecto a la actividad de la enzima no se puede elucidar algo certero salvo que cuenta con un dominio CwIO1.

Del gen *cwIO* anotado en el genoma de *Bacillus subtilis* (cepa 168) se sabe que el C terminal muestra actividad DL-endopeptidasa, actividad hidrolítica de la pared celular. Dentro de este gen no se ha encontrado actividad de unión a pared celular en el extremo N terminal.

Con base en la información obtenida se propone que la proteína de 70 kDa contenga dentro de su estructura la actividad DL-endopeptidasa debido al dominio conservado CwIO1 y aunado a este es posible que exista un dominio de unión que si bien no se encuentra registrado en la base de datos, abre la posibilidad a la complementación funcional de una PGH y además sería razón para esperar un incremento de aminoácidos y por tanto de peso molecular, pues la secuencia de la proteína de referencia cuenta con un peso teórico de 48.5 kDa. (<http://www.uniprot.org/uniprot/P40767>).

Con base en los zimogramas realizados podemos decir que la proteína de 70 kDa tiene actividad lítica contra *S. Tiphymurium*.

◆ Proteína de 95 kDa

AOA0M2AWV6\_ENTFL (100%), 54,405.1 Da

N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Enterococcus faecalis EnGen0354 GN=WO5\_00270 PE=4 SV=1

23 exclusive unique peptides, 47 exclusive unique spectra, 748 total spectra, 240/501 amino acids (48% coverage)

```

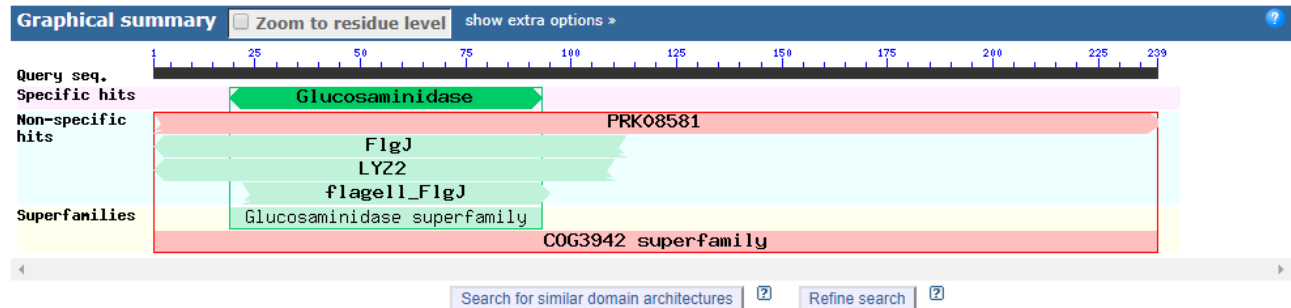
M K K Q F A L F S T   L L L L G S S M P V   G A F A E G N N L V   A E N S S V A E T T   A E A T T A E A T E   T T A T S E T T E A
T E E S T T E T E S   S T E P S E S T T T   E S T E T S G T E T   T D S T T D S T S T   S T T E S T T D S T   S T S T T E S T T D
S T S T S T T E S S   T T P T T T P S S S   K E Q P K P G T S T   S E S K Q P A K P V   T P T A P A E K P V   E Q P A A S T P Q P
E I V P P V T N E T   V G L V E D D E T F   T V S K T K K T E E   F I Q E I G E S A R   K V A K D K N L Y A   S V M I A Q A I L E
S G S G N S K L S Q   K P N Y N L F G I K   G D Y K G Q S V S F   I T Y E D N G F G N   L Y T V E A K F R Q   Y P T Y K E S M E D
Y A K L L K N G L D   S N K D F Y H G V W   K T E A K S Y K E A   T R F L T G K Y A T   D K D Y H K K L N A   L I K T Y D L T Y Y
D K E K A T V E P M   E S N F P A Y N G K   N Y D T F N S Y A W   G N C T Q Y V Y N R   I T Q L G K R V D L   T M G N G Q D W G E
T G R A R G Y K V S   R T P K A G A A V S   F P A G V L G A D N   T Y G H V A F V E K   V F K D G S I L I S   E M N V K G L N V V
S T R T I S A D E T   H L M N Y I V P K D   K

```

Conserved domains on [tcl|Query\_40738]

View Standard Results ?

95 kDa protein OPT1 +



Name	Accession	Description	Interval	E-value
[+] PRK08581	PRK08581	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; Validated	1-239	2.11e-96
[+] FigJ	COG1705	Flagellum-specific peptidoglycan hydrolase FigJ [Cell wall/membrane/envelope biogenesis, Cell ...	1-113	1.57e-34
[+] LY22	smart00047	Lysozyme subfamily 2; Eubacterial enzymes distantly related to eukaryotic lysozymes.	1-110	1.86e-20
[+] Glucosaminidase	pfam01832	Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase; This family includes ...	19-93	1.57e-17
[+] flagell_FigJ	TIGR02541	flagellar rod assembly protein/muramidase FigJ; The N-terminal region of this protein acts ...	22-95	1.14e-12

Blast search parameters

Data Source: Live blast search RID = 99R0W8KW014  
 User Options: Database: CDSEARCH/cdd v3.16 Low complexity filter: no Composition Based Adjustment: yes E-value threshold: 0.01 Maximum number of hits: 500

La proteína de 95 kDa puede relacionarse con la N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa de 54 kDa de *E. faecalis*.

Dentro de la secuencia se identifica el COG3942 el cual es un antígeno de superficie relacionado con la pared celular y membrana.

Conserved Protein Domain Family: COG3942

Superfamily. Surface antigen [Cell wall/membrane/envelope biogenesis]

Descripción: **N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase** [*Enterococcus faecalis*]

Max score 474 Total score 474 Query cover 100% E value 8e-167 Ident 81%

Número de acceso OTP42345.1

La actividad identificada consiste en hidrolizar los enlaces entre residuos N-acetilmuramoil y L-amino ácidos en ciertos glucopéptidos de la pared celular. A esta actividad se asocia la actividad lítica de la banda observada en zimogramas donde podemos observar actividad contra las 5 bacterias de prueba: *L. monocytogenes*, *S. Tiphymurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica*. De las 3 proteínas seleccionadas por su actividad lítica, la proteína de 95 kDa destaca debido a que tiene actividad contra todas las bacterias probadas.

## 9. Conclusiones

La mejor formulación de la película para obtener una base en la cual se inmovilizaron los compuestos antimicrobianos fue a partir de 5 % de almidón de maíz con 0.4 (w/w glicerol).

Para elaborar la película activa, se requiere una concentración de proteína de 640 mg de proteína/mL para producir 100 cm<sup>2</sup> de la película con actividad antimicrobiana.

Las características de las películas activas (tales como espesor, punción y permeabilidad al vapor de agua) satisfacen los requerimientos para obtener una película efectiva, sin embargo, es deseable poder aumentar la resistencia a la extensión de la película, ya que el valor obtenido corresponde al 41% con respecto a la referencia. La solubilidad, se sabrá si es que esta será o no una limitante hasta que se haya probado la película directamente sobre algún producto cárnico.

La inmovilización de los compuestos antibacterianos fue satisfactoria ya que se demostró la actividad antibacteriana de las películas contra microorganismos patógenos como: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* y *S. Typhimurium*; además se observó la conservación de la actividad tras 7 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4 °C)

Se identificaron las proteínas cuya actividad lítica era notable, la proteína de peso molecular experimental de 32 KDa presenta actividad endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, la proteína de 70 KDa presenta actividad de petidoglucano hidrolasa presuntamente como endopeptidasa y la proteína de 95 KDa presenta actividad amidasa.

La actividad antibacteriana de las películas activas es el resultado del conjunto de la actividad lítica de todos los compuestos antibacterianos presentes en el concentrado proteínico, de las cuales en este trabajo sabemos que son: enterocina AS-48, endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, endopeptidasa y amidasa.



## 10. Bibliografía

Appendini P. y Hotchkiss J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.

Barros-Velazquez J. (2016). Antimicrobial Food Packaging. Academic Press. 6, 9, 96-101, 142, 143, 236, 237.

Ben Amara C., Eghbal N, Oulahal N, Degraeve P Y Gharsallaoui A. 2016. Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Research International* 89, 272-280.

Beristain-Bauza S.C., Mani-López M., Palou E. y López-Malo A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control* 62, 44-51.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brena B. y Batista-Viera F. (2006). Immobilization of Enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Human Press. 2, 15-30.

Byun Y., Zhang Y. y Geng X. (2014). Plasticization and Polymer Morphology. *Innovations in Food Packaging*. Chapter 5. 87-108.

Callewaert L., Walmagh M., Michiels C.W., y Lavigne R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164-171.

D'Agostino M y Cook N. (2016). Foodborne pathogens. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier.

De Araújo G. (2015). Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2080–2087.

De Vuyst L., Foulquié Moreno M.R. y Revets H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 299–318.

Fang Z., Zhao, Y., Warner, R.D. y Johnson, S.K. (2017). Active and Intelligent Packaging in Meat Industry. *Trends in Food Science & Technology*.

Fisher K. y Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-57.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1999). Los Carbohidratos En La Nutrición Humana. Volumen, alimentación y nutrición, 74,75.

García P., Rodríguez L., Rodríguez A. y Martínez B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 373-382.

Ghosh A., Gupta T., Swaminathan J. y Wright. D. (2015). Mechanical and anti-pathogenic characterization of starch-based materials. *Polymer Testing*, 43, 78-82.

Giraffa G. (2003). Funcionalidad de enterococci en productos lácteos. *International journal of Food Microbiology*, 88(2), 215-222.

Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J. L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58, 206-211.

Khan H., Flint S y Yu P. (2010). Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 1-10.

Malhotra B., Keshwani A y Kharkwal H. (2015). Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-9.

Maliničová L., Píknová M., Pristaš P. y Javorský P. (2010). Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 463–472.

Martínez-May R. D. (2014). Propiedades mecánicas, permeabilidad y biodegradabilidad de películas plásticas de almidón y lambda carragenina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.

Maqueda M., Galvez A., Bueno M.M., Sanchez-Barrena M.J., Gonzalez C. *et al.* (2004). Peptide AS-48: Prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein &Peptide Science*, 5, 399-416.

Nascimento T.A., Calado V. y Carvalho C.W.P. (2012). Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. *Food Research International*, 49(1), 588–595.

Panesar P.S., Marwaha S.S y Chopra H.K. (2010). Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications. I. K. International Pvt Ltd. 267.

Park H., Byun Y, Kim Y., Whiteside W. y Bae H. (2014). Processes and Applications for Edible Coating and Film Materials from Agropolymers. *Innovations in Food Packaging*. Chapter 10. 257-275.

Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar Jonathan y Martín-Belloso O. (2007). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 313-327.

Serrano-Maldonado E., García-Cano I., González-Canto A., Ruiz-May E., Elizalde-Contreras M y Quirasco M. (2018). Cloning and characterization of a novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28, 14-27.

Shirai, K., Guerrero, I. y Lara P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47, 125-137.

Siragusa G.R. y Dickson J.S. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Beef Tissue by Application of Organic Acids Immobilized in a Calcium Alginate Gel. *Journal of Food Science*, 57(2), 293-296.

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K. y Bigger S.W. (2003). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408-420.

Verbeek, C.J.R., Bier, J.M. 2011. Synthesis and characterization of thermoplastic argopolymers. A handbook of Applied Biopolymer Technology, Synthesis, Degradation and Applications. Royal Society of Chemistry, London pp. 197-242.

Vollmer W., Joris B., Charlier P. y Foster S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Review*, 32, 259-286.

Yener F., Korel F. y Yemenicioglu A. (2009). Antimicrobial Activity of Lactoperoxidase System Incorporated into Cross-Linked Alginate Films. *Journal of Food Science*, 74(2), 73-79.

<http://bccm.belspo.be/catalogues/lmg-search-results?FIRSTITEM=1&LIST1=STRNUM&TEXT1=20681&FIRSTITEM=1&LIST2=SPECIES&TEXT2=&FIRSTITEM=1&LIST3=ORIGSUBST&TEXT3=&FIRSTITEM=1&LIST4=ORIGIN&TEXT4=&FIRSTITEM=1&LIST5=ALL+FIELDS&TEXT5=&CONJ=OR&RANGE=20&B3=Run+Query>

- Anexo 1.

Propiedades mecánicas: esfuerzo nominal.

La información inicial proviene del gráfico de Fuerza (N) vs tiempo (s) obtenida de las pruebas con el equipo SINTECH 1/S.

Del gráfico se extrajo la fuerza de fractura y con ésta se puede calcular el esfuerzo nominal.

$$\sigma = F/A$$

$\sigma$ : Esfuerzo nominal (Pa)

F: fuerza aplicada a la película

A: área de la película sobre la que se aplicó la fuerza  $m^2$  (corresponde al área transversal en las pruebas de punción  $A = 0.0001327 m^2$ ; en las pruebas de elongación corresponde al producto del espesor de la película por el ancho de los listones = 1 cm)

- Anexo 2

Permeabilidad al vapor de agua

Transmisión al vapor de agua (WVT, g / h  $m^2$ )

$$WVT = m/A$$

m: pendiente g/h (registro gravimétrico)

A: área de la película

Permeancia  $Wp$  ( g/ m h Pa)

$$Wp = [ WVT/ S (R1 - R2) ] * th$$

S: Presión de vapor de agua (Pa) a la temp de prueba

R1: HR del desecador, expresada como fracción

R2: HR de la celda, fracción

th: espesor de la película (m)

- Anexo 3

Componentes del medio TSA.

Componente	Cantidad
Digerido pancreático de caseína	15.0 g
Digerido péptico de soya	5.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

pH 7.3 ± 0.2

Cantidades por Litro.

- Anexo 4

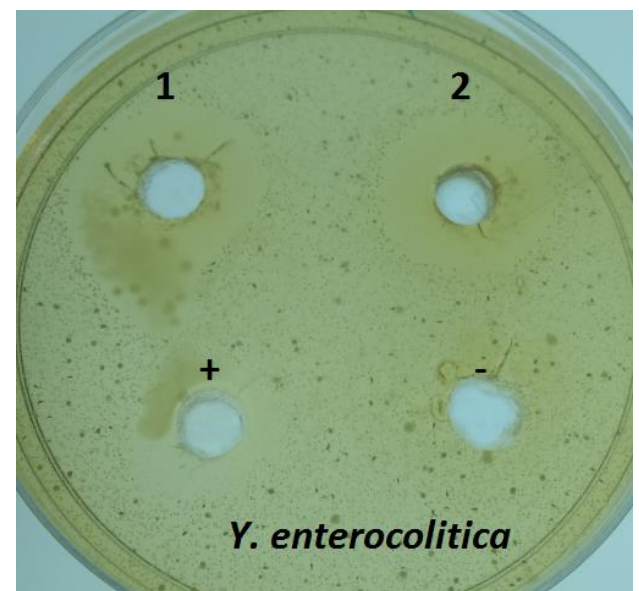
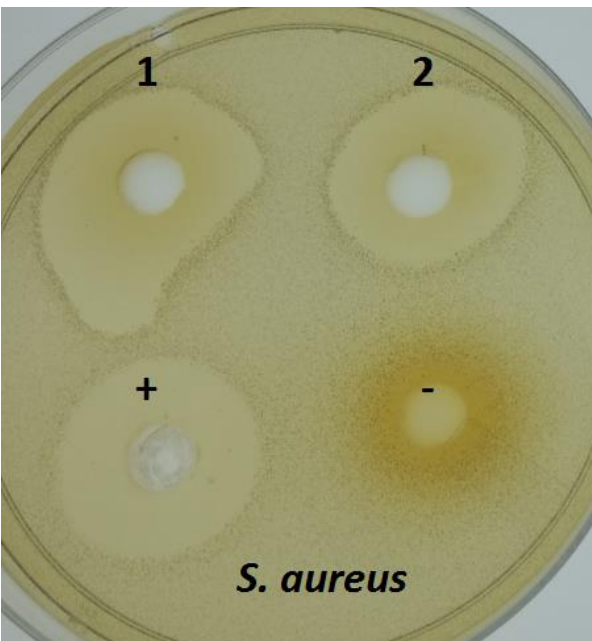
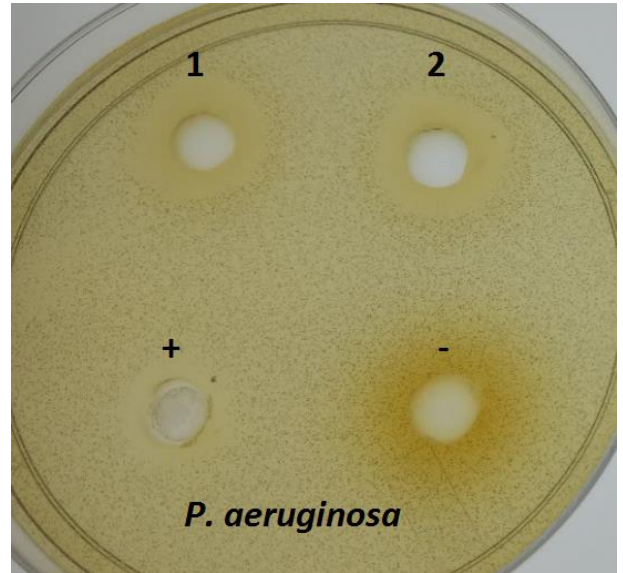
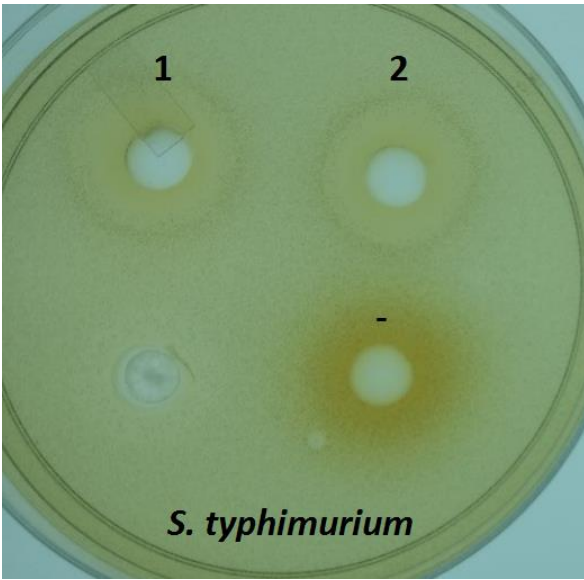
Imágenes de las difusiones en agar del concentrado liofilizado.

Difusión en agar del sobrenadante producido por *E. faecalis* LMG 02681, el sobrenadante fue neutralizado y concentrado mediante liofilización, posteriormente resuspendido en buffer de fosfatos 100 mM pH 7,02. (El volumen del buffer para resuspender era una décima parte del volumen inicial antes de congelar la muestra).

En todas las cajas se encuentra el sobrenadante por duplicado indicado como 1 y 2.

Se utilizó como control negativo el medio BHI liofilizado y resuspendido en buffer de fosfatos y como control positivo nisaplin 10 mg/mL.

Se utilizó una capa inferior de 10 mL de BHI agar (1%) y una capa superior del mismo medio (0.7% agar). 24h de incubación a 37°C



- Anexo 5

Difusiones en agar de la biopelícula con el extracto antimicrobiano incorporado.

En todas las cajas se encuentra un cuarto de la biopelícula (área aproximada de 2.4 cm<sup>2</sup>) por duplicado indicado como 1 y 2.

Se utilizó una capa inferior de 10 mL de BHI agar (1%) y una capa superior del mismo medio (0.7% agar). 24h de incubación a 37°C.

Para cada microorganismo se muestran dos fotografías, la que se encuentra del lado izquierdo corresponde a la actividad de la película activa en el momento en que la película se había terminado de elaborar y secar, la imagen a la derecha corresponde a la actividad de la película cuando la película había sido almacenada en refrigeración después de 7 días.

