



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE
PELÍCULAS COMESTIBLES DE AISLADO DE PROTEÍNA
DE SOYA ADICIONADAS CON ANTIMICROBIANOS DE
ORIGEN NATURAL.

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

ERICK ORLANDO CASTILLO FLORES

DIRECTOR: D.C. RAÚL ÁVILA-SOSA SÁNCHEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS: M.C. MARTIN ALVARO
LAZCANO HERNÁNDEZ



MAYO 2018

INDICE GENERAL

	Página
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	5
Capítulo 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
Capítulo 3: JUSTIFICACIÓN	46
Capítulo 4: OBJETIVOS	47
Capítulo 5: DIAGRAMA DE TRABAJO	48
Capítulo 6: MATERIALES Y MÉTODOS	49
Capítulo 7: METODOLOGÍA	50
Capítulo 8: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
Capítulo 9: CONCLUSIONES	57
Capítulo 10: SUGERENCIAS	58
Capítulo 11: BIBLIOGRAFÍA	59

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Clasificación de los alimentos según su deterioro.	7
Tabla 2: Microorganismos y sus riesgos.	12
Tabla 3: Clasificación de los serovares de <i>Salmonella</i> de acuerdo a su especificidad al huésped y tipo de infección causada por ellos en su huésped.	22
Tabla 4: Factores que permiten el crecimiento y la producción de enterotoxina por <i>S. aureus</i> .	28
Tabla 5: Tabla de pruebas bioquímicas que facilitan la diferenciación con otras enterobacterias.	31
Tabla 6: Virotipos de <i>E. coli</i> relacionados con afecciones diarreicas.	35
Tabla 7: Métodos y referencias.	49
Tabla 8: Equipos.	49
Tabla 9: Resultados <i>Escherichia coli</i> .	54
Tabla 10: Resultados de <i>Klebsiella sp.</i>	55
Tabla 11: Resultados de <i>Salmonella sp.</i>	55
Tabla 12: Resultados de <i>Staphylococcus aureus</i> .	56

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	División de microorganismo de acuerdo a su finalidad en los alimentos.	12
Figura 2	Tipos de alteraciones en los alimentos.	13
Figura 3	Avances tecnológicos de la conservación de los alimentos.	16
Figura 4	Las familias de los genes únicos en cada serovar de <i>Salmonella</i> .	20
Figura 5	El genoma de <i>Klebsiella</i> dividido en 3 clusters.	25
Figura 6	<i>Staphylococcus aureus</i> adherido a acero Inoxidable.	27
Figura 7	Estructura química del cinamaldehído.	36
Figura 8	Estructura química del timol	37
Figura 9	Estructura química carvacrol.	38
Figura 10	Representación esquemática de la producción de películas y recubrimientos comestibles.	39
Figura 11	Películas comestibles adicionadas con antimicrobianos.	54

Resumen:

El presente trabajo establece algunos puntos de relevancia para la industria alimentaria, mediante el estudio del uso de proteínas vegetales y aceites esenciales en combinación. Esta investigación establece la necesidad de ayudar y contribuir con el aporte de conocimientos en el área de los recubrimientos comestibles conformando su uso así como la sustitución de los materiales sintéticos que inciden en la salud del consumidor y el medio ambiente. Son descritos los métodos de formulación y formación de películas comestibles hechas a base de proteínas vegetales. Se utilizó el método de conteo en placa para evaluar el comportamiento antimicrobiano en las películas comestibles. Los resultados de la capacidad antimicrobiana de las películas comestibles combinadas con antimicrobianos de origen natural (timol, carvacrol y cinamaldehído) en interacción con bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.* y *Staphylococcus aureus*), fueron variables tanto en inhibición como en la no inhibición, concluyendo que son *E. coli* y *Salmonella sp.* sensibles a la presencia de carvacrol y cinamaldehído en películas comestible, en contraste con *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella sp.* que fueron resistentes a las películas adicionadas con antimicrobianos en las tres variantes. Las 4 bacterias fueron escogidas por la relevancia actual que presentan en la salud de los consumidores esto para determinar si la implementación de estas películas comestibles es factible en el procesamiento de alimentos.

1. INTRODUCCIÓN

Todos los alimentos sufren un proceso natural metabólico que causa que estos tengan una apariencia indeseable para el consumo humano debido a los cambios en sus características sensitivas. La comida deteriorada debería ser segura para comer, es decir, no debería causar enfermedades porque no hay patógenos o toxinas presentes pero los cambios en la textura, olor, sabor o apariencia los hacen ser rechazados. Esto es atribuido, según los ecologistas, a los microorganismos degradadores que al producir un olor desagradable repelen animales grandes, de este modo los recursos alimenticios se los guardan para ellos. Se pueden plantear 3 puntos a abordar para poder entender estos comportamientos, que desde siempre han repercutido en el consumidor, pero también en el medio ambiente:

Primero, la mala conservación de los alimentos o el desdén por no conservarlos de forma adecuada. Para poner en perspectiva la relación existente entre la producción de comestibles con el deshecho de estos, en 1995 el Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2005) estimó una pérdida mayor a 43 millones de toneladas de comida en Estados Unidos por comerciantes, servicios de comida y consumidores. Si el 20% de un cultivo es perdido, en consecuencia el 20% del fertilizante y agua usada para irrigar para hacer crecer ese cultivo también fue perdido. Por mencionar solo un campo de merma en el mal consumo, conservación y distribución de los alimentos. Cuando un consumidor llega a rechazar un alimento en mal estado puede deberse a los cambios en sus características y cualidades sensitivas tales como los cambios enzimáticos, oxidación lipídica, oscurecimiento no enzimático, cambios de color, cambios de sabor, la degradación por microorganismos, entre otros. Los cambios producidos por enzimas endógenas de los productos agrícolas pueden ser originados a partir de procesos como la conservación post-cosecha, oxidación por fenolasas, etc. Compuestos lipídicos en frutas y vegetales tienen cambios que son mayormente ocasionadas por la exposición a la luz, la concentración de oxígeno ambiental, altas temperaturas y la actividad de agua. Se consideran factores cruciales en la aceptación de los productos los cambios físicos en las frutas y vegetales, de tal forma que si el consumidor nota la falta de humedad, como consecuencia de una barrera de

protección inadecuada o la falta de esta, el comprador declinara el consumo del alimento.

Segundo, considerando de manera remarcada que los productos agrícolas son cultivados, crecidos y cosechados directamente del suelo, sufren un exceso de manipulación desde su transporte hasta que el consumidor lo tiene en la mesa, la cantidad de microorganismos va creciendo en todo el proceso de manera exponencial. Si bien debemos prestar atención a la microbiota no nociva que pudieran afectar la calidad de un producto, hoy en día el tema de interés en la conservación de los alimentos es la inocuidad, o bien, la presencia de patógenos en los productos, que pasan de ser un riesgo potencial a ser un riesgo actual para el consumidor sino se guardan las medidas necesarias para su inhibición.

Tercero, desde su invención en la década de 1930 el uso del nylon como material ligero y de recubrimiento se ha diversificado como consecuencia a la necesidad de prolongar la vida útil de los alimentos, hasta que nos alcanzan hoy en día las consecuencias del uso indiscriminado. Los plásticos tirados en la tierra evitan la producción de nutrientes en el suelo, debido a esto la fertilidad del suelo es reducida y afecta el sector agricultura. Peor aún cuando estos componentes persisten en el suelo pueden hacer un gran daño, causando desordenes inmunológicos y enzimáticos, interrupción hormonal que conducen a desordenes endócrinos e incluso infertilidad como también son considerados carcinogénicos, por mencionar algunos y no se implementan de manera sustancial los recubrimientos comestibles o los amigables con el medio ambiente. Las consecuencias a este desequilibrio no solo afectan a la salud de los humanos, también afectan peligrosamente la vida animal y alteran el medio ambiente sustancialmente causando contaminación peligrosa.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Deterioro de los alimentos

Un alimento está alterado cuando en él se presentan cambios que limitan su aprovechamiento. Sus características organolépticas son modificadas y esto los hace no aptos para el consumo, sin que ello suponga siempre que sean peligrosos para la salud. Entre estas causas se distinguen por su origen; las debidas a agentes físicos, químicos y biológicos, por escoger una de las diferentes divisiones o bien por la forma en que se deterioran con el tiempo (tabla 1) (Elika, 2018).

Tabla 1. Clasificación de los alimentos de acuerdo a su deterioro con el tiempo (Elika, 2018).

Estabilidad	Descripción
Estables o no perecederos	Son aquellos que contienen menos de un 12% de agua libre. Por ejemplo, azúcar, harina, alubias secas, entre otros.
Semiperecederos	Contienen menos de un 60% de agua libre o tienen ácidos o azúcares que dificultan el desarrollo microbiano. Es el caso de las patatas, manzanas, nueces sin cáscara, entre otros. Si se manipulan y conservan de forma adecuada tardan en alterarse
Perecederos	Se alteran con facilidad si no se utilizan procedimientos de conservación específicos.

Por otra parte los factores externos están bien identificados; los *factores físicos* se originan principalmente por alteraciones de las estructuras internas del alimento y ruptura de células, de manera que se permite la entrada de microorganismos que producen deterioro. Los daños responsables del deterioro son principalmente: raspones, heridas, exposición a temperatura inadecuadas, cambios de humedad. Las variantes más consideradas en la conservación de los alimentos son *factores mecánicos*; como golpes, cortes, en general sin alteraciones graves, pero que suponen una disminución de la vida útil del alimento. Estos factores suelen actuar durante los procesos de cosecha y los tratamientos posteriores.

Aunque en general, no suelen alterar las características nutricionales de los alimentos pero sí su susceptibilidad al ataque de los microorganismos y su palatabilidad (Herrera y Troyo 2011).

Los factores físicos que afectan la apariencia de los productos alimentarios son; la *temperatura, humedad, aire, luz y tiempo*. *Tiempo*; las actividades químicas y enzimáticas doblan su velocidad cada 10°C, por lo que aceleran los procesos de descomposición (Bello, 2000), cuando esta temperatura es súbita la textura y la apariencia de los alimentos se ve afectada así como su valor nutricional también, asimismo existen nutrientes especialmente sensibles al calor (algunas vitaminas). Un alto porcentaje de los microorganismos se desarrolla entre los 5 °C y los 60 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento los 37°C temperatura en la cual la humedad ambiental puede facilitar el desarrollo de estos, en cuyo caso los grupos de interés de acuerdo a la concentración de oxígeno son tres: aerobios: aquellos que requieren la presencia de oxígeno para crecer anaerobios; aquellos que no crecen en presencia de oxígeno y facultativos; los que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por ello se recomienda que en el tratamiento de los alimentos habrá que mantenerlos bien por debajo o bien por encima de las temperaturas de desarrollo bacteriano. Por encima de los 100°C los microorganismos empiezan a morir, o sea, las temperaturas superiores a las de crecimiento óptimo producen inevitablemente la muerte del microorganismo o le producen lesiones subletales. Las células lesionadas pueden permanecer viables pero son incapaces de multiplicarse hasta que la lesión haya sido reparada, mientras que si se sitúan por debajo de 0°C no mueren pero el crecimiento queda inhibido. Las temperaturas de refrigeración, entre 4°C y 8°C, son relativamente seguras (Herrera y Troyo 2011; Elike, 2018).

Uno de los métodos para poder combatir la inevitable contaminación de las bacterias degradadoras las cuales son un riesgo potencial para la aceptabilidad de los productos, como los microorganismos patógenos los cuales son considerados un riesgo real en la calidad alimentaria ha sido el tratamiento con bajas temperaturas. Aunque aplicadas en exceso y de forma no controlada afectan las características sensoriales de igual manera, deteriorándolos de tal forma que las cáscaras se

agrietan y entran microorganismos que pueden alterarlos perdiendo color y muchas hortalizas se marchitan. Estas alteraciones hacen que los productos sean más susceptibles a la invasión por microorganismos, deterioradores y patógenos. A baja temperatura las rutas metabólicas de los microorganismos se ven alteradas, como el caso del choque en frío muchos microorganismos que resisten la temperatura de refrigeración mueren como consecuencia de ello (Elika, 2018).

Humedad. Aunque a veces suele ser un factor difícil de controlar, este siempre se considera ya que ambientes húmedos favorecen el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, cuanto más húmedo sea el ambiente, mejor se desarrollan estos microorganismos. Mucha sequedad hace que se formen costras o defectos en las superficies de los alimentos.

Aire. La concentración de oxígeno es un factor selectivo importante en todos los ambientes incluido el alimento, influye en los tipos de microorganismos presentes y en su metabolismo además puede alterar algunas proteínas produciendo cambios de color, facilitando la oxidación. Cuando la cáscara de algunas frutas o vegetales es removida se expone al oxígeno del aire ocurriendo un oscurecimiento enzimático. Por ejemplo, cuando troceamos o pelamos una manzana o una papa la exponemos al aire, estos alimentos rápidamente adquieren un color oscuro en su superficie (Herrera y Troyo 2011).

Luz. Altera el valor nutricional de algunos alimentos al destruir las vitaminas, también hace que algunos alimentos se pongan rancios y otros pierdan el color.

Tiempo. Aunque pudiera pasar desapercibido la gran mayoría de los alimentos, es un enemigo pero no más importante, nada sustituye la frescura. El desarrollo de microorganismos, la destrucción por insectos además la luz progresan con el tiempo siendo difícil luchar con él.

Factores químicos. Los agentes químicos que no son pertenecientes al alimento pueden ser agregados a éstos en forma intencional o accidental. Los plaguicidas son utilizados para proteger a los cultivos contra las plagas, su dosificación excesiva deja residuos en el alimento el cual al ser consumido, produce una acumulación de dichas

sustancias en el cuerpo, provocando reacciones alérgicas o enfermedades como el cáncer. La transferencia de olores y sabores extraños al alimento se consideran también como una alteración dichos olores extraños pueden provenir de detergentes, desinfectantes y perfumes (Herrera y Troyo 2011; Elika, 2018).

También se consideran los factores químicos que se suelen manifestar especialmente durante los procesos de almacenamiento de los alimentos. Su efecto puede afectar de forma notable la comestibilidad del alimento: enranciamiento, pardeamiento, etc. *La reacción de Maillard* que se refiere al pardeamiento no enzimático incluye una serie de reacciones complejas entre azúcares y compuestos nitrogenados (proteínas), las cuales generan pigmentos marrones. En algunos casos se producen de manera tecnológica (fritos y tostados) pero en otras es espontáneo. El calor así como la desecación lo favorecen, otro cambio inherente de los alimentos es el *enranciamiento o ranciamiento* de lípidos que se produce por reacciones de hidrólisis y oxidación. Se forman compuestos volátiles que dan olores y sabores característicos. El enranciamiento es más frecuente en grasas insaturadas (aceite, pescados y frutos secos) (Martins y col., 2001).

El potencial Hidrógeno (pH) juega un papel importante en la conservación de los alimentos. Cada microorganismo tiene un pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo, el rango óptimo oscilaría entre 6,6 – 7,5. En general, la presencia de ácidos en el alimento produce una importante reducción de la supervivencia de los microorganismos. Los ácidos fuertes producen una rápida bajada del pH externo, aunque su presencia en la mayoría de los alimentos es inaceptable (FDA, 2013).

La actividad de agua, referida como la relación entre el agua libre presente en el alimento respecto al agua total que podría contener a una misma temperatura, es un parámetro estrechamente ligado a la humedad el cual es un punto de partida para determinar la conservación y propagación microbiana del alimento. Por ejemplo el manejo de este atributo se considera un método de la mejora en la conservación de los alimentos y es a menudo suficiente para evitar la alteración del alimento, con la consigna de que la reducción de la actividad vaya acompañada de otros factores. Tal

es el caso del desecado o deshidratación ya sea por la exposición o aireación o por medio de un curado del producto (Barbosa y col., 2008).

Por último, los *factores biológicos* suelen ser los agentes más importantes alterantes de los alimentos pueden ser clasificados en intrínsecos como las enzimas y los extrínsecos como parásitos o microorganismo. Algunas *enzimas* sobreviven a los propios microorganismos pudiendo incluso aumentar su actividad. En contraste algunas cambian la textura de los alimentos, tal es el caso de la maduración de los frutos o reblandecimiento de la carne, pero pueden acabar provocando su descomposición. Los animales sufren rigor mortis, el cual no es otra cosa que un cambio enzimático ocurrido al faltar la circulación sanguínea, y por lo tanto la oxigenación necesaria para el metabolismo aerobio (Herrera y Troyo 2011).

Parásitos. Son competidores naturales, estos acostumbran ser insectos, roedores y pájaros que disputan por la obtención del alimento, lamentablemente en nuestros intereses son muy destructivos. En donde están presentes hacen daño, echan a perder las cosechas y los alimentos almacenados, sumando que transportan muchos microorganismos en sus cuerpos, contaminando el producto y así convirtiéndolo en un peligro para el consumo. Uno de los factores con más relevancia son *los microorganismos* debido a que el ambiente está lleno de ellos y pueden contaminar los alimentos usando varias vías por ejemplo; en el manejo del producto, contacto con las superficies, por contaminación de origen (p.e. la leche al pasar por el canal de la ubre), malas prácticas higiénicas en general sin duda los que producen las transformaciones más indeseadas y abundantes. En algunos casos pueden suponer riesgos para la salud de las personas, siendo las infecciones microbianas el problema más grave de la alimentación humana, después del hambre y la sobrealimentación. Lo anterior, exceptuando los microorganismos que le dan un valor agregado a los productos parcial o total, conocidos como alimentos fermentados (Herrera y Troyo 2011).

La tabla 2 muestra los microorganismos relevantes señalando sus riesgos:

Tabla 2. Microorganismos y sus riesgos (Autoría propia).

Levaduras	Mohos	Bacterias
Transforman alimentos rápidamente (Fermentación).	Producción de toxinas. Resistencia a condiciones extremas.	Son abundantes. Elevada tasa de reproducción. Capacidad de producir toxinas. Capacidad de ser infecciosas

Los microorganismos tienen un metabolismo que ocupan para sobrevivir, el resultado de su metabolismo es la transformación de los alimentos en sus características, aunque tampoco usan nutrientes del producto sino que pueden estar presentes en ellos sin tener una interacción directa con ellos. La Figura 1 presenta otra subdivisión de los microorganismos.

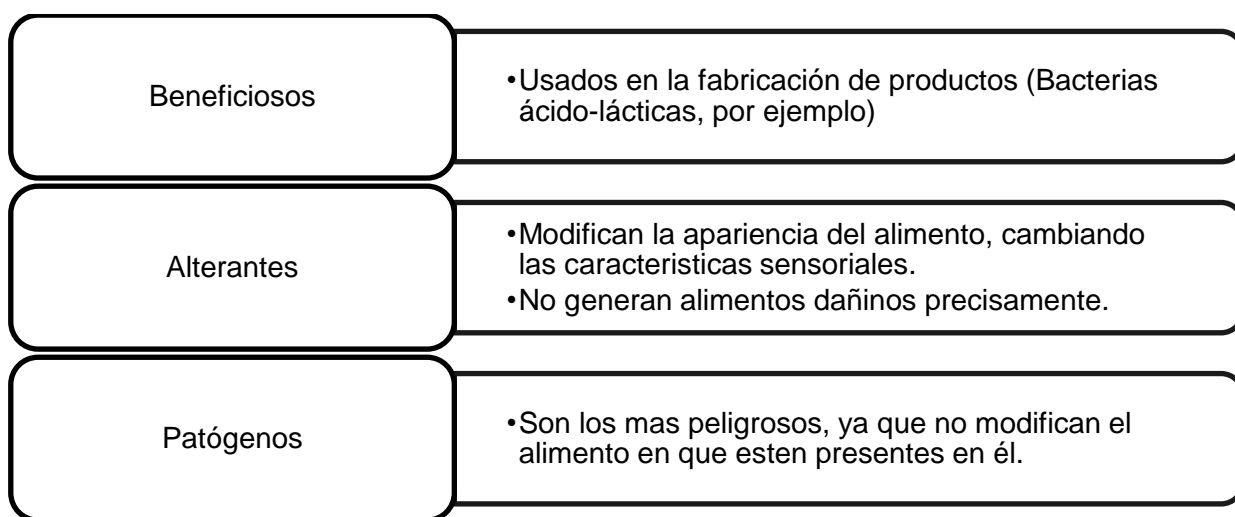


Figura 1. División de microorganismos de acuerdo a su finalidad en los alimentos (Elika. 2018).

De lo anterior se condensan todos los factores mencionados que alteran los alimentos en la Figura 2.

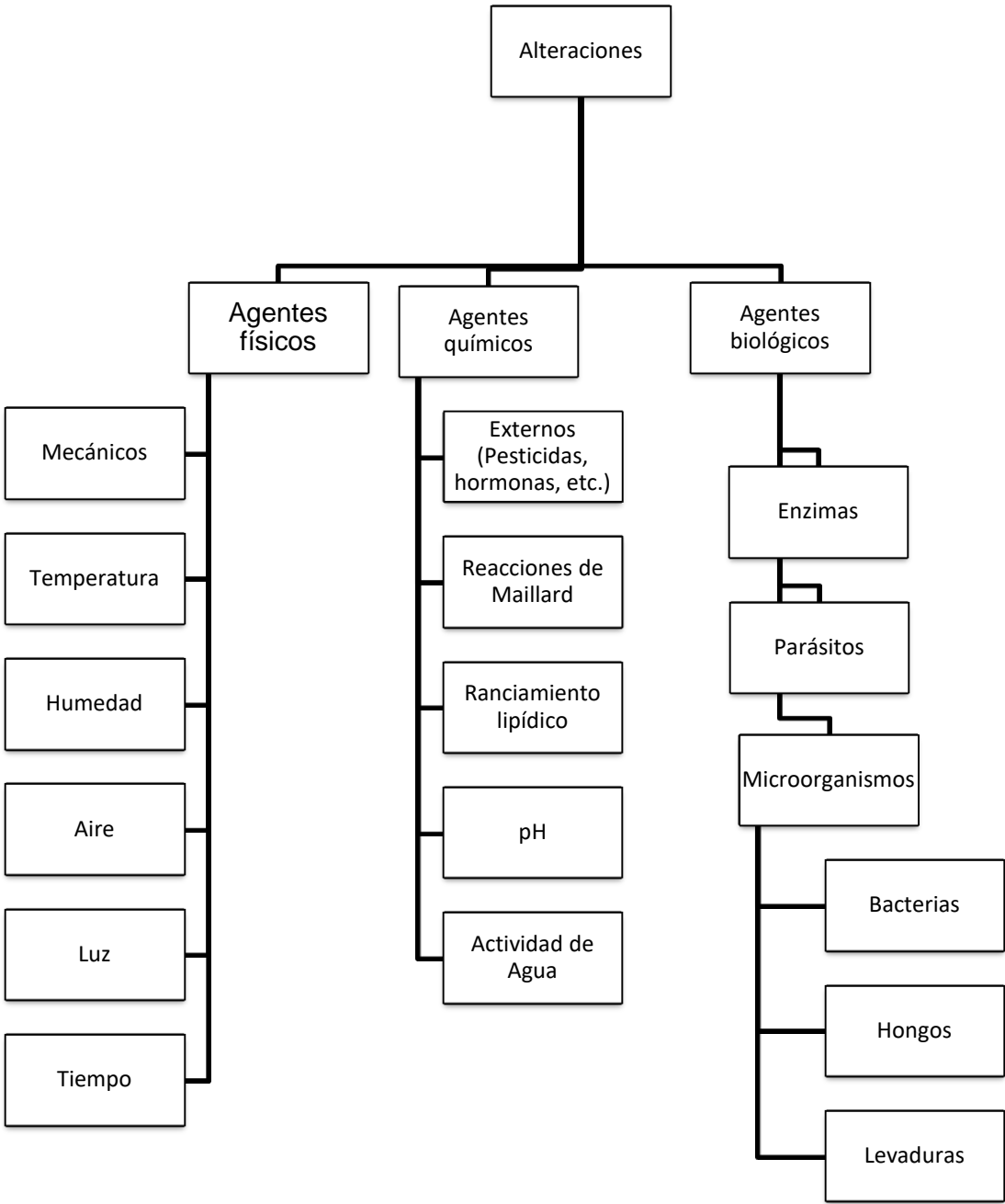


Figura 2. Tipos de alteraciones en los alimentos (Autoría propia).

2.3 Historia alimentaria y su conservación.

Los comportamientos alimentarios constituyen hábitos muy interiorizados, adquiridos en la infancia así como reforzados a lo largo de los años y de las experiencias; convertidos en rutina, ya que forman parte del día a día, al mismo tiempo presentan un fuerte componente afectivo además de relacional, ya que se construyen en el ámbito familiar, se consolidan en el marco de la *comensalidad* cotidiana y, la festiva. (Díaz y col., 2014). Profundizando en el concepto de identidad alimentaria lo que define a un grupo de personas y sobre todo define qué es lo que consume, son rasgos característicos que dan sentido de pertenencia tales como el gusto por la comida hogareña, la diferenciación o en su defecto la negación a comer alimentos ajenos a su comunidad. Las personas que logran hacerse de un estilo propio han sido sometidas a cambios drásticos en su estilo de vida o su medio ambiente. Tomando como ejemplo a los migrantes, que, sea cual sea, la causa de su traslado, siempre buscan en los nuevos lugares algo que les haga recordar sus raíces, o algo que emule sus gustos gastronómicos entonces es cuando ocurre el cambio alimenticio y se transforma la identidad alimentaria. Esto da lugar a que se conformen dos conceptos de identidad alimentaria en los grupos de personas que llevan consigo: el “fondo de cocción” y el “fondo de especias”. El primero hace referencia al conjunto de alimentos seleccionados para ser destinados a una comida, el modo particular de preparar y cocinar los alimentos en su lugar natal. Abarca desde cómo cortarlos, mezclarlos hasta el método de cocción, por ejemplo, guisado, asado, ahumado, hervido. El segundo hace referencia a los condimentos específicos además de saborizantes que se utilizan para elaborar esas comidas, la manera en cómo se combinan, el momento específico de preparación y/ o cocción en que se integran a una preparación, de esta forma el ser humano se ha visto en la necesidad de preservar sus alimentos, encontrando formas más fáciles o más convenientes con el paso del tiempo (Díaz y col., 2014).

El mayor obstáculo de la industria alimenticia es la vida útil limitada de los productos alimenticios, una consecuencia de las reacciones de oxidación tales como degradación, obscurecimiento enzimático y la rancidez oxidativa. (Soliva, R., y col. 2003). Existen tecnologías para extender la vida útil en fresco de los productos

hortofrutícolas en post-cosecha, para preservar del ataque de organismos patógenos y conservar la calidad general. De tal suerte, que cuando en el supermercado existe una diversidad de alimentos que se encuentran en diferentes presentaciones (caja, botella, sachet, lata, frasco, bolsa, etc.) así como conservados por distintos métodos. Estos alimentos conservados o preservados son sometidos a tratamientos apropiados de conservación o preservación, el lugar que los provee, los mantiene en debidas condiciones higiénico- sanitarias para que sean aceptados por el consumidor en lapsos de tiempo que pueden variar. El proveedor de insumos, planea prevenir o evitar el desarrollo de microorganismos y así prolongar su vida de anaquel (Álvarez, 2012).

Las condiciones socio-económicas, las tradiciones y ritos alimenticios así como el variable cambio de estilo de vida han ido cambiando además de evolucionar a lo largo de la historia humana y con ellos los métodos utilizados para conservar sus alimentos. Este siempre ha sido el rumbo de las sociedades, inventar así como evolucionar las distintas maneras de conservar alimentos producidos y tenerlos disponibles más tiempo (Díaz y col., 2014).

En la historia, la necesidad de conservar los alimentos aumenta con el surgimiento de la agricultura (10, 000 años), además el incremento en la escala de producción trae como consecuencia la necesidad de conservarlos. La conservación estaba limitada al consumo familiar, su utilización estaba condicionada por el clima; los métodos utilizados se generaban por ensayo y error; los alimentos producidos tenían características y vida útil variable. En los inicios de la conservación cuando se empezaron a utilizar en climas fríos el congelamiento aunque también recurrían al ahumado, sazón y encurtido. Para contrastar, en los climas cálidos, era aprovechada la estación invernal para el salado, secado y especialmente la fermentación. Algunos métodos han pasado la prueba del tiempo llegando a utilizarse en combinación. Cuando estos métodos de conservación sobreviven al paso de los años, se va viendo que se pueden enriquecer con los nuevos descubrimientos. Poniendo en perspectiva, la sequía de avances en la conservación tuvo una pausa hasta el siglo XVII con los acontecimientos en el plano tecnológico y científico que significaron un

avance en la tecnología de la preservación de los alimentos (Barón, 2005). Los cuáles serán mencionados en la figura 3 de acuerdo a su importancia:

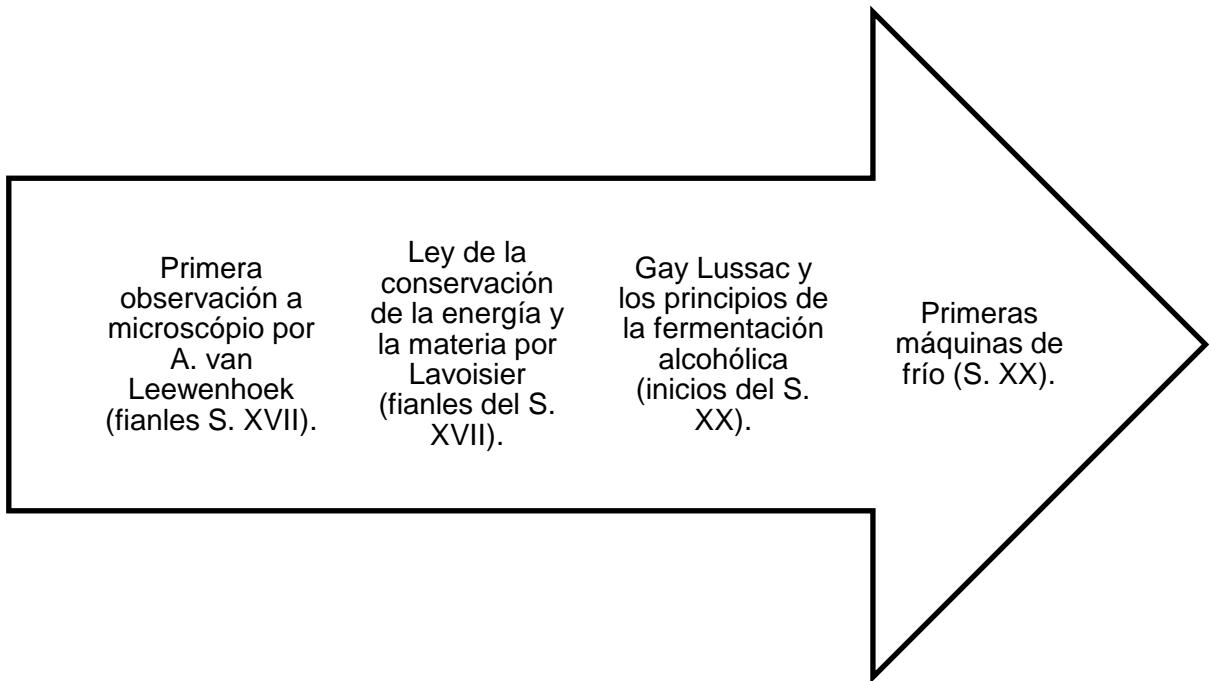


Figura 3. Estos fueron los avances tecnológicos de la conservación de los alimentos más significativos hasta finales del S. XVII y principios del S. XX (Barón, 2005).

2.3.1 Inicios de los recubrimientos comestibles.

Películas comestibles, como la cera en algunas frutas, han sido usadas por siglos para prevenir la pérdida de humedad y para crear una superficie brillante en la fruta para propósitos estéticos. Estas prácticas fueron aceptadas mucho antes que sus asociaciones químicas se entendieran, llevándose a cabo hasta hoy en día. El término, filme comestible, han sido relacionados con aplicación en alimentos solo en los pasados 50 años. En la mayoría de los casos los términos película y recubrimiento son usados de forma variable para indicar que la superficie de un alimento está cubierta por una capa relativamente delgada de material de cierta composición. Sin embargo, una película es ocasionalmente diferenciada de un recubrimiento debido a la noción de que esta es material de envoltura independiente, mientras que un recubrimiento es aplicado y formado directamente en la superficie del alimento mismo. Hoy en día, el uso de una película comestible se ha expandido rápidamente para mantener la calidad de una amplia variedad de alimentos (Pavlath

y Orts, 2009). Las películas o recubrimientos comestibles constituyen capas delgadas de materiales que son adecuados para su consumo y los cuales actúan como barrera contra diferentes agentes (vapor de agua, oxígeno y humedad). Ayudan a mejorar la calidad extendiendo la vida útil de alimentos frescos y procesados. La adición de compuestos activos tales como antioxidantes, a estas películas y recubrimientos pueden mejorar sus propiedades funcionales además hacerlos potencialmente aplicables en la conservación de los alimentos (Sánchez y col., 2011). Es por esto que la tecnología de recubrimientos está siendo estudiada de una década atrás hasta nuestros días con la esperanza de descubrir más virtudes y aumentar su uso en la industria alimentaria.

En resumen, ante la variedad de métodos y técnicas de conservación es de vital importancia considerar que el proceso o técnica que sea utilizado debe ser aplicable al alimento, debe prolongar su vida útil y debe evitar que este sea modificado en sus características nutricionales además de sensoriales originales, sin alterar de forma negativa el valor nutricional.

2.4 Modernización de la conservación en los alimentos

El incremento en el uso de polímeros sintéticos en varias aplicaciones como películas y recubrimientos de empaque ha dejado serios problemas ecológicos debido a su falta de biodegradabilidad (Guilbert, 1986). En consecuencia, los biopolímeros naturales son atractivos para usos innovadores como materiales “verdes”, por su naturaleza renovable y biodegradable (Graaf y Kolster, 1998). Las investigaciones enfocadas en el uso de polímeros biodegradables en aplicaciones técnicas se han expandido considerablemente en años recientes (Krochta y Mukder, 1997), no solo para resolver los problemas ambientales asociados con el uso de polímeros sintéticos sino también a encontrar nuevos mercados para la sobreproducción de la agricultura oriental.

Cualquier tipo de material usado para cubrir varios alimentos para extender su vida útil en el producto que pudiera ser comido junto con el alimento con o sin alguna remoción adicional es considerado una película o revestimiento comestible (Pavlath, y Orts, 2009). Las películas comestibles pueden ser claras u opacas, una cubierta,

pero los consumidores generalmente prefieren cubiertas invisibles y claras. El recubrimiento comestible puede ser obtenido de diferentes formas, por inmersión del producto o por aplicación con cepillo o spray con una solución que contiene los ingredientes de la película, para depositar la película directamente en la superficie del alimento (Gontard y col., 1994), por creación de la película misma a partir de una solución o a partir de termoformación para la subsecuente cubierta de la superficie del alimento.

Hay una tendencia a la alza en relación al incremento del consumo de frutas y vegetales frescos. El consumo de frutas frescas en los Estados Unidos en el 2000 fue 28% arriba del promedio anual del consumo de frutas en 1970, y el consumo de vegetales frescos fue de 26% por encima del promedio anual del consumo de vegetales para el mismo periodo (USDA, 2005). Esto ha sido asociado con un mayor interés en una dieta sana y se espera que siga creciendo con el tiempo. En relación al uso de películas y recubrimientos comestibles ha sido estudiado como una alternativa para la preservación de frutas además de vegetales recién cortados, debido a que tales películas pueden crear barreras semipermeables a gases y vapor de agua, manteniendo la calidad del producto (Gordon, 2005).

2.5 Proteínas y sus ventajas en el uso de formación de películas comestibles.

La investigación y el desarrollo en películas y recubrimientos hechos a partir de algunas proteínas agrícolas se han llevado a cabo los últimos 20 años, es por el aumento del interés, debido a la demanda por reemplazos amigables con el medio ambiente además de renovables para materiales poliméricos y plásticos derivados del petróleo. La demanda de las películas y recubrimientos se han hecho a partir de recursos renovables, tales como caseína, suero, soya, cebada de maíz, colágeno, semilla de gluten, queratina y albumina de huevo. Aquellas hechas a partir de proteínas agrícolas crean nuevas salidas estos productos, bioproductos y vías de deshecho, todos los cuales pueden impactar en la economía de los procesos alimentarios de manera positiva (Pavlath y Orts, 2009).

Debido a la capacidad de la caseína de formar películas resistentes a al agua, fue usada por cientos de años en pinturas y cubiertas (Gettens y Stout, 1984). En el reciente siglo diecinueve, la caseína fue convertida en un material plástico duro por reticulación con formaldehído. Una patente para esta tecnología se emitió a Adolf Spitteler en Bavaria (Brother, 1940), y fue usada para la manufactura de productos, tales como botones, sombrillas, manijas, cajas pequeñas y estuches para lapiceros.

Un mejor objetivo en preparar películas de diferentes tipos de comida (por ejemplo, fruta y vegetales) es para asegurar que las películas generadas proporcionen propiedades físicas así como químicas necesarias para mantener la transmisión de varios gases y líquidos a los mismos ritmos como ocurre en sus sistemas nativos. Las estructuras químicas de los tres mayores componentes usadas para preparar películas difieren ampliamente, y por lo tanto se atribuye a que cada componente tiene diferentes propiedades generales.

Las películas comestibles pueden ser preparadas a partir de proteínas, polisacáridos, lípidos o la combinación de estos tres componentes (Gontard y col., 1994). Las propiedades inherentes de las proteínas las hacen un excelente material de partida para películas y recubrimientos (Pavlath y Orts, 2009). Las películas de proteínas son las más atractivas; Primero, están supuestas a proveer valor nutricional, segundo; las películas a base de proteína tienen impresionantes propiedades de barrera de gas comparadas con aquellas a base de lípidos y polisacáridos (Gontard y col., 1994). Cuando las películas no están húmedas, la permeabilidad de oxígeno de una película a base de proteína de soya fue de 500, 260, 540 y 670 veces más baja que el polietileno de baja densidad, metilcelulosa, almidón y pectina respectivamente (Cuq y col., 1998).

2.6 *Salmonella sp.*

Salmonella enterica son bacterias Gram- negativas filo muy cercano de *Escherichia coli*. Hay más de 2, 500 serovares diferentes, basado en un antígeno de superficie “O” específico en una parte de la larga cadena variable de lipopolisacaridos en la membrana externa en la bacteria, muchos de los cuales pueden causar enfermedades intestinales localizadas (enteritis y diarrea) en un amplio rango de huéspedes. Algunos serovares también se pueden diseminar del intestino y causar una enfermedad sistémica de una forma específica al huésped (fiebre entérica, fiebre tifoidea o salmonelosis no tifoidea) (Bumann y Schorchorst, 2017; Singh, 2013). Havelaar y colaboradores en 2015 identificaron a *Salmonella* como la mayor causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. De los 2, 500 serovares caracterizados hasta el momento, 1, 500 pertenecen a *Salmonella enterica*, la figura 4 representa los diferentes serovares de *Salmonella enterica* con el genoma central y con los genes únicos marcados en negro.

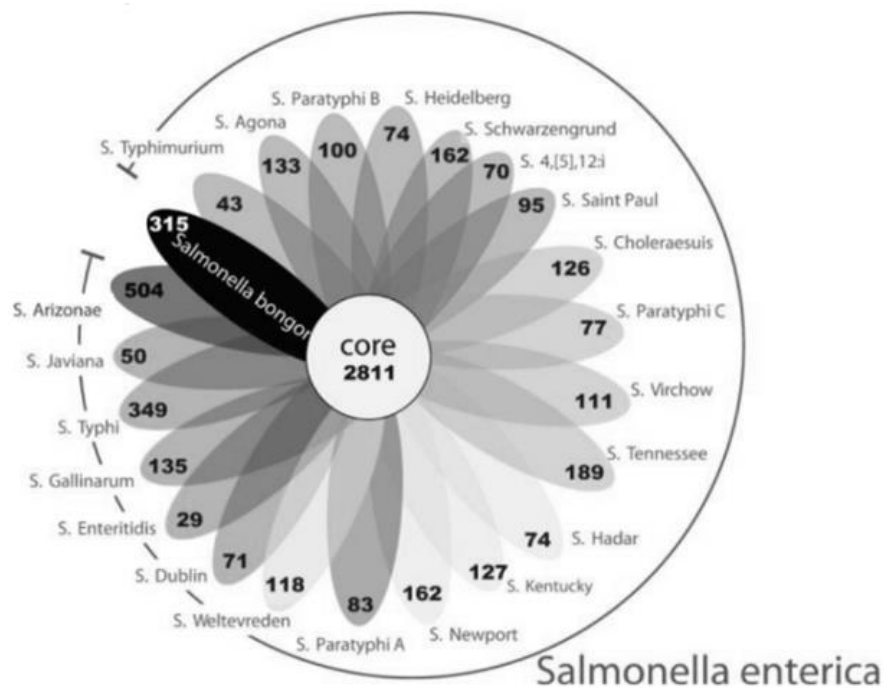


Figura 4. Una representación en racimo mostrando las familias de los genes únicos en cada serovar de *Salmonella* con un genoma central marcado en el medio (Singh, 2013).

La vacuna para la prevención de enfermedades humanas está disponible pero solo para el serovar *Thyphi* y tiene solo una moderada eficacia protectora. Sumado a esto, la quimioterapia antimicrobiana (tratamientos farmacológicos) se vuelve menos y menos efectiva debido al incremento súbito de la multiresistencia farmacológica, y tanto el CDC (Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos, por sus siglas en inglés) como la Organización Mundial de la Salud incluyen a *Salmonella* entre las enfermedades infecciosas más serias que amenazan la salud humana. Después de *Campylobacter*, *Salmonella* es la segunda bacteria más predominante que causa gastroenteritis por alimentos a nivel mundial. *Salmonella* se dispersa antes que otra, por las heces de animales domésticos, agua contaminada, pobres métodos de fertilización, y otras prácticas agrícolas. Los diferentes serotipos de *Salmonella* pueden crecer y sobrevivir en varios tipos de comida.

El comportamiento de *Salmonella* en alimentos es gobernado por una variedad de factores ecológicos y medio ambiente. Estos incluyen actividad de agua, composición química, la presencia de agentes antimicrobianos naturales o añadidos, temperatura de almacenamiento y factores de procesamiento, tales como la aplicación de calor y manipulación física (Mahmoud, 2012). A pesar de esto el comportamiento de *Salmonella* depende de su habilidad de infectar una variedad de huéspedes, es así como se divide en tres grupos de serovares. El primero incluye serovares los cuales tienen una amplia gama y también son llamados serovares sin restricción ya que estos infectan casi todos los animales, dentro de los que se encuentran *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis* (Clarke y Gyles, 1993). En otras características de este grupo tenemos su capacidad zoonótica mejorada comparada con sus otras contrapartes, sus mecanismos para invadir diferentes huéspedes sin alguna resistencia. Los serovares que causan una infección sistémica severa se encuentra en el segundo grupo, usualmente son excretados sin algún síntoma clínico cuando infectan accidentalmente a un huésped diferente a sus preferidos o más adaptados, es por esto que son referidos como “Serovares Adaptativos al Huésped” (Jacobsen y col., 2011).

El tercer grupo comprende a los serovares que son restrictivos con un huésped muy en específico; Son conocidos como “Serovares de Huésped Restrictivo”. De manera

característica causan infección sistemática y a menudo resulta ser fatal con su huésped, también tienen la capacidad de modular su ambiente en el cuerpo del huésped a su beneficio de tal forma que causa alto tropismo en los órganos linfáticos (Jacobsen y col., 2011). La tabla 3 muestra los 3 grupos de serovares y sus huéspedes más representativos.

Tabla 3. Clasificación de los serovares de *Salmonella* de acuerdo a su especificidad al huésped y tipo de infección causada por ellos en su huésped (Singh, 2013).

Grupo	Serovares	Huésped	Infecciones
Serovares sin restricción	<i>S. Tiphymurium</i> <i>S. enteritidis</i>	Humanos, aves de corral, ganado y ratones	Enterocolitis en humanos y cerdos. Las aves de corral son portadoras asintomáticas y ganado. Septicemia en ratones.
Adaptados al huésped	<i>S. dublin</i> <i>S. cholerasuis</i>	Ganado, puercos, aves de corral, raramente humanos, ratones y pollos	Septicemia, enterocolitis en ganado. Infecciones sistemáticas fatales en cerdos. Bacteriemia en humanos y ratones
Restrictivos al huésped	<i>S. Typhi</i> <i>S. gallienarum</i> <i>S. abortusequi</i>	Humanos, aves de corral y caballos	Thifus, diarrea, septicemia. Conduce a abortos en yeguas.

2.6.1 *Salmonella* y el rol que tiene en los alimentos.

A lo largo de los sistemas de producción, *Salmonella* es más frecuentemente aislado de aves de corral (pollo, pavo, pato y faisán) que de otros animales (Freitas y col., 2010). También puede ser transmitido por las heces de estos animales ya que todos los serotipos crecen en el intestino de estos animales además de la cadena de eventos se puede alargar cuando el manejo así como el transporte de los derivados no es el correcto se propician las condiciones óptimas para su reproducción. La transmisión de *Salmonella* desde las plantas productoras de comida procesada y el equipo de producción es un problema serio para la salud pública. *Salmonella* puede entrar en la cadena de procesamiento en cualquier punto: cultivo, granja, alimento para ganado, procesamiento y almacenamiento de comida (Wong y col., 2002). *Salmonella* es la bacteria patógena más común asociada con una variedad de alimentos, los cuales no se remiten solo a productos marinos, también aves, huevos, leche y sus derivados, carne de res y de cerdo.

La facilidad con que *Salmonella* sobrevive e incrementa su población en estos alimentos se debe básicamente a que, in vivo, *Salmonella* requiere síntesis de nuevo de componentes de biomasa tales como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos para moléculas precursoras, los cuales son fácilmente alcanzados por la bacteria en una gran gama de alimentos o su microambiente habitual, buscando fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y sulfuro. Sin embargo esta bacteria no se remite a obtenerlos de su ambiente, sino también los obtiene de su reserva interna como glucógeno o lípidos (Bumann y Schorthorst, 2017). La habilidad nutricional de *Salmonella* así como su capacidad metabólica modularán la generación global de biomasa además de su proliferación y así el estado físico de *Salmonella* en el tejido del huésped durante la infección. Es muy importante mencionar que el estado físico (la capacidad de producir descendencia viable) no está siempre relacionado con su virulencia (la capacidad de causar alguna patología en el huésped) (Monahan y Harry, 2016).

De hecho, algunas mutaciones de *Salmonella* causan patología intestinal de tipo agresivo en infecciones de una sola cepa en el modelo de enteritis en ratón (Faber y col., 2017). No obstante, tales rutas metabólicas parecen ser muy raras con la posible excepción de la biosíntesis de los ácidos lipídicos. Finalmente el estudio de sus enzimas metabólicas y de supervivencia parecen tener mayor relevancia para el estudio de *Salmonella* para poder comprender mejor cómo atacar de manera efectiva al microorganismo.

En conclusión, la comida es claramente un vehículo de infección. Este rol vital en los brotes de salmonelosis llama a medidas estrictas para minimizar su transmisión, tales como el manejo apropiado animal y prácticas agrícolas, la protección de los recursos y agua de la contaminación, métodos adecuados en el manejo de desechos y un esfuerzo en general para mantener un ambiente limpio cerca de la comida. Adicionalmente, gran parte del riesgo ocupado por *Salmonella* puede ser mitigado a través del manejo adecuado y buenas prácticas higiénicas, incluyendo el lavado y desinfección, prevención del pre-consumo, contaminación humana durante la preparación y almacenaje, eliminación de restos, cocinar antes de consumir, uso de temperaturas de refrigeración y el uso de recubrimientos biodegradables para mantener en condiciones deseables los alimentos.

2.7 *Klebsiella* sp.

En la familia Enterobacteriaceae, fue nombrada por Trevisan en 1885 en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs y, en su momento, las primeras descripciones sobre este microorganismo fueron el de una especie de bacilos capsuladas aislados de pacientes con rinoscleroma reportadas por Frish en 1882 y en ese entonces fue nombrado como "*Klebsiella rhinoscleromatis*" por Trevisan. Históricamente el género *Klebsiella* ha causado confusión iniciando con Friedländer cuando describió una bacteria recuperada de pulmones de pacientes que murieron de neumonía y el microorganismo fue nombrado como "*Hyalococcus pneumoniae*" (McCoy y McClung, 1939). A partir de este hallazgo y otros similares hubo muchas variantes debido a la falta de objetividad al describir a la bacteria por su similitud con la bacteria "*Bacterium lactis aerogenes*" por Escherich en 1885, fue renombrado como

“*Bacillus aerogenes*” por Kuse en 1896, y posteriormente “*Enterobacter aerogenes*” por Hormaeche y su colaborador en 1960. Fue una bacteria fermentadora de varios carbohidratos con producción de gas ocasional, reacción positiva de Vogler-Proskauer y la adición de la prueba de descarboxilación, *Klebsiella pneumoniae* fue definida como no móvil y ornitina descarboxilasa negativo, mientras que “*Aerobacter aerogenes*” fue definida, en contraparte, como móvil o no móvil y ornitina descarboxilasa positiva (Lin y col., 2004).

Concretamente el género *Klebsiella* son bacilos no móviles, aerobio y anaerobio facultativos, Gram negativa y comprende a *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* subp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subp. *rhinocleromatis*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica*, etc (Abbott, 2007).

Sin embargo la comparación de las secuencias genómicas de cada especie muestra la heterogenicidad del género, por consiguiente se pueden arreglar 3 clusters, como se muestra en la figura 5:

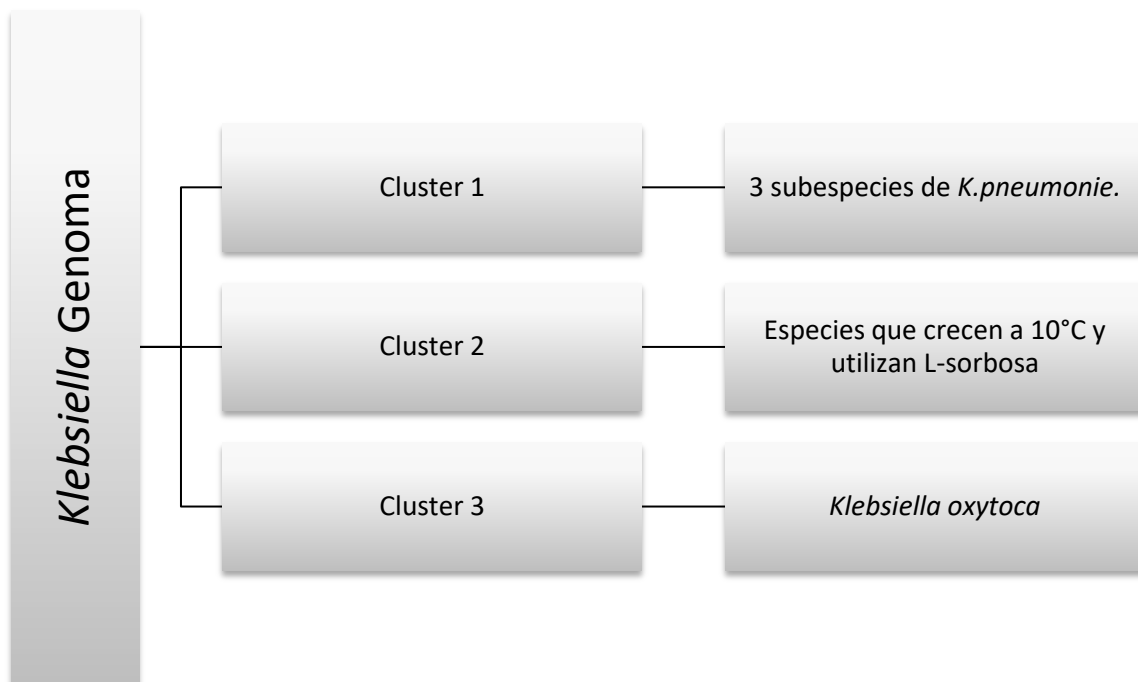


Figura 5. El genoma de *Klebsiella* dividido en 3 clusters (Autoría propia).

Miembros del genero *Klebsiella* usualmente tienen capsulas compuestas de ácidos polisacáridos complejos. Dichas capsulas parecen ser esenciales para la virulencia de *Klebsiella*, protegiendo la bacteria de fagocitos o neutrófilos y prevenir su muerte con los factores del suero humano (Podschun y Ullman, 1998). Las cepas que expresan capsulas serotipo K1 y K2 pueden ser especialmente virulentas. En específico aquellas cepas que pertenecen al serotipo capsular K1 parecen ser particularmente más virulentas comparadas con las cepas que pertenecen al serotipo K2 debido a que las cepas serotipo K1 tienen de manera exclusiva el gen *magA* el cual las provee de capacidades virulentas y poder, en determinados casos, causan abscesos en el hígado del huésped (Yeh y col., 2006). En contraste, algunas cepas del serotipo capsular K2 pueden ser menos virulentas, lo que sugiere que otros factores de virulencia pudieran otorgarle el factor de riesgo; posiblemente incluyen pilis, sideróforos y polisacáridos extra capsulares (Lin y col., 2004).

2.8 *Staphylococcus aureus*.

Resulta ser uno de los microorganismos que más se monitorea en la industria alimentaria, por su riesgo latente de causar envenenamiento “staphylococcico” de los alimentos. *Staphylococcus aureus* es comúnmente encontrado en el ambiente (suelo, agua y aire) y en los humanos en nariz y en la piel (FDA, 2012).

Históricamente fue descrito por Sir Alexander Ogston, cirujano escoces, como la causa de muchas infecciones patógenas humanas. En 1882, le dio el nombre de *Staphylococcus*, que proviene del griego *staphyle* que se traduce como un desayuno tardío de uvas y *coccus* que se traduce como grano o baya tras su descubrimiento bajo el microscopio (Adams y Moss, 2008). Los primeros brotes de envenenamiento de comida por *staphylococci* fueron sospechados por Vaughan y Sternberg después de investigar un brote en Michigan, pero no fue sino hasta 1914 que Barber lo demostró cuando analizó el consumo de leche de vaca con mastitis *staphylococcia* y posteriormente Dack filtró la enterotoxina staphylococcica en 1930.

2.8.1 Características microbiológicas de *S. aureus*.

Estamos hablando de una bacteria Gram positiva, no esporulada, con forma esférica ovoide de un largo de 1µm, perteneciente al género *Staphylococcus* (Talan y col., 1989, Adams y Moss, 2008) (Figura 6). *S. aureus* produce una enterotoxina staphylococcica la cual es responsable de casi todas los envenamientos de la comida por *S. aureus* (FDA, 2012). Actualmente existen 27 especies y 7 subespecies del género *Staphylococcus* de las cuales la producción de enterotoxinas es asociada con *Staphylococcus aureus* de manera no exclusiva.

Bioquímicamente es catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobio facultativo, fermenta la glucosa, lo cual la diferencia del genero *Micrococcus*, y de forma particular la producción de su enterotoxina se ve afectada de manera negativa por condiciones anaeróbias.

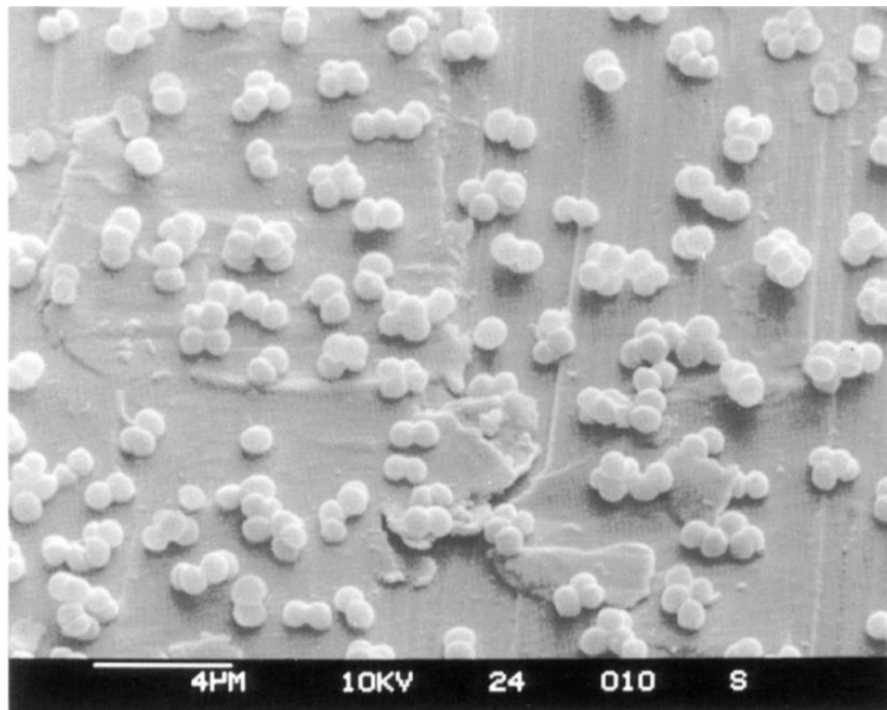


Figura 6. *Staphylococcus aureus* adherido a acero inoxidable (Adams y Moss, 2008).

2.8.2 Crecimiento y características de supervivencia.

S. aureus es un microorganismo clásico mesófilo que depende de un número de factores tales como temperatura, actividad de agua, potencial Hidrógeno, presencia de oxígeno y composición del alimento, en determinados casos. Como la gran mayoría de microorganismos, los parámetros físicos varían entre cada cepa (Stewart, 2003). El rango de temperatura de crecimiento oscila entre 7 y 48°C aunque la temperatura óptima es 37°C. La enterotoxina staphylococcica puede ser producida en el rango de los 35 a 40°C (Adams y Moss, 2008) (Tabla 4). *S. aureus* es resistente a temperaturas de refrigeración y sobrevive bien a temperaturas de almacenamiento por debajo de los -20°C; sin embargo no resiste a los procesos de pasteurización o cocción. Este microorganismo tiene un rango óptimo de pH de crecimiento de entre 6.0 a 7.0, con un límite máximo de pH de 4.0 a 10.0, por otra parte, se necesita un pH cercano a 6 para lograr una pequeña producción de enterotoxina, no obstante este factor depende de las características del medio (Adams y Moss, 2008, ICMSF 1996; Stewart, 2003).

Tabla 4. Factores que permiten el crecimiento y la producción de enterotoxina por *S. aureus* (ICMSF, 1996).

	Crecimiento Bacteriano		Producción de Enterotoxina	
	Óptimo	Rango	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	37	7-48	35-40	10-45
pH	6.0-7.0	4.0-9.8	5.3-6.8	4.8-9.0
Concentración de NaCl	0.5-4.0%	0-20%	0.5%	0-20%
Actividad de agua	0.98->0.99	0.83->0.99	>0.99	0.86->0.99
Condiciones atmosféricas	Aerobio	Aerobio- Anaerobio	5-20% CO ₂	Aerobio- Anaerobio

2.8.3 Asociación y aparición en alimentos.

La presencia de un pequeño número de *S. aureus* en comida no es algo común o ni siquiera normal. De forma habitual aparece en aves de corral y otros tipos de carne cruda como un componente frecuente de la microbiota de la piel. Similar a esto,

puede ser aislada de leche bronca donde algunas veces puede estar elevada como resultado de una mastitis por *S. aureus* procedente de la ubre. Sin embargo, ya que no es una bacteria muy resistente a los cambios de temperatura, tendrá problemas en su crecimiento y supervivencia al pasar por procesos de pasteurización y cocción. A pesar de que *S. aureus* coloniza una amplia gama de animales, estos no son la fuente principal de contaminación, sino las personas que manejan los alimentos (Montville y Matthews., 2008). Probablemente, la contaminación por manejadores de alimentos es el caso más frecuente en vista de la alta tasa de transporte humano (Adams y Moss, 2008). La colonización de la nariz y garganta con el organismo implicará automáticamente su presencia en la piel, de igual forma los alimentos podrían estar contaminados de infecciones por heridas en la piel o por toser o estornudar.

2.8.4 Brotes.

La prevalencia de la toxina staphylococcica en manejadores de alimentos va a variar entre empresas y también entre países. Algunos estudios sugieren un rango del 2% de manejadores de alimentos en Italia portan la enterotoxina (Talarico y col., 1997), 12% de los sobrecargos en Finlandia (Hatakka y col., 2000) y hasta el 62% de los manejadores de alimentos de una industria de pescado en India (Simon y Sanjeev, 2007). Un estudio realizado en Turquía entre el 2007 y 2008 encontró la presencia de la enterotoxina staphylococcica en 11.3% en carne, 10.2% en leche no pasteurizada, 8% en productos lácteos, un 3.5% en productos de panadería y 2.3% de productos de consumo rápido (Aydin y col., 2011). Estudios en E.U. y R.U. han resuelto que carnes saladas como el jamón y carne en conserva son particularmente vulnerables a *S. aureus* ya que la bacteria no se ve afectada por las concentraciones de sal que podrían inhibir a una amplia gama de microbiota del medio ambiente. Otros brotes han sido causados por quesos duros, dulces fríos y productos de panadería (Adams y Moss, 2008).

2.9 *Escherichia coli*.

Un pediatra alemán llamado Theodor Escherichia en 1885 descubrió al bacilo, que posteriormente sería nombrado *Escherichia coli*, de heces fecales de niños sanos y en su momento lo llamó *Bacterium coli* por el hecho de que fuera encontrado en el colon. Su temprana clasificación procariota la situó en un género basado en su motilidad y su forma, aunque posteriormente fue reubicado en el reino Monera por la clasificación de Ernst Haeckel (Kamran y col., 2014). Esta bacteria pertenece formalmente al grupo llamado “coliformes” los cuales son miembros de organismos entéricos conocidos como la familia Enterobacteriaceae (George y Garrity, 2005).

E. coli es un habitante casi universal del intestino humano y otros animales de sangre caliente donde es el facultativo anaerobio predominante, aunque un componente menor de la microbiota total. Conocido al principio como “*Bacterium coli commune*”, en 1911 fue renombrado como *Escherichia coli* en honor al descubridor (Meng y Schroeder, 2007). Generalmente es un comensal inofensivo, puede ser un patógeno oportunista causante un gran número de infecciones tales como la sepsis Gram negativa, infecciones del tracto urinario, neumonía en paciente inmunosuprimidos, y meningitis en neonatos. Se encuentra comúnmente en heces, un personaje generalmente no patogénico, y con características de supervivencia en agua condujeron a la adaptación de *E. coli* como indicador de contaminación fecal y la posible presencia de patógenos entéricos como *S. Typhi* en el agua. Este uso se transfirió a los alimentos donde se requiere mayor atención en interpretar el significado de resultados positivos (Adams y Moss, 2008).

Las cepas de *E. coli* que fueron primero reconocidas como la causa de gastroenteritis por trabajadores en Inglaterra investigando una diarrea de verano en infantes en los tempranos años 40, pero no fue sino hasta 1982 que se dividió en 3 cepas que producen diarrea: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC).

2.9.1 Taxonomía y características microbiológicas.

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulada, en forma de barra recta (1.1-1.5µm - 2.0–6.0µm), agrupado en pares o solos, presenta movilidad por medio de un flagelo aunque también puede ser no móvil, puede presentar capsulas o microcápsulas y de la familia Enterobacteriaceae, es una de seis del género *Escherichia* (otros incluyen *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*, *E. blattae*, *E. albertii*) (Meng y Schroeder, 2007, Flatamico y Smith, 2006). Dentro de sus comportamientos bioquímicos encontramos algunos definitivos y algunos variables, dependientes de la cepa: oxidasa negativo, catalasa positiva, fermentador de Glucosa, lactosa, S-manitol, D-sorbitol, arabinosa y maltosa, reduce nitratos, y es β-galactosidasa positiva, indol y rojo de metil positivo (tabla 5) (Doyle y Padhyem, 1989).

Tabla 5. Tabla de pruebas bioquímicas que facilitan la diferenciación con otras enterobacterias (Adams y Moss, 2008).

Bacteria	Indol	Rojo de Metil	Voges Proskauer	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Shigella</i>	V	+	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+

2.9.2 Patogénesis.

Hoy en día, de acuerdo con el mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico existen 6 grupos de patogenicidad reconocidos Enterotoxigénica *E. coli* (ETEC), Enteropatógena *E. coli* (EPEC), Enterohemorrágica *E. coli* (EHEC), Enteroinvasiva *E. coli* (EIEC), Enteroagregativa *E. coli* (EAEC), y *E. coli* de adhesión difusa (DAEC). De estos, la FDA en el 2012 identificó a los primeros 4 como transmisibles por

comida o agua contaminada, en especial EHEC es comúnmente implicada en los mayores brotes de infecciones por comida a nivel mundial (Rodríguez, 2002).

2.9.2.1 *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC).

ETEC es altamente móvil, Gram negativo, con forma de barra recta, coloniza la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (Colonization Factor Antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas: termolábiles y termoresistentes (FDA, 2012). La enfermedad que causa ETEC es gastroenteritis en humanos, también conocida como la causante de la diarrea del viajero y normalmente los síntomas se presentan en 12 y 36h después de la ingestión de alimentos contaminados con este microorganismo. Dichos síntomas se identifican desde una diarrea afebril hasta evacuaciones acuosas parecidas al cólera sin presencia de moco o sangre, dolor de estómago y vómitos, aunque usualmente la enfermedad es autolimitante, persistiendo por 2 o 3 días ETEC también es una causa importante de diarreas en infantes menores de dos años, en países en vías de desarrollo, causando deshidratación severa. En el mismo orden de ideas, la frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática además de poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h (Adams y Moss, 2008; FDA, 2012; Rodríguez, 2002).

La mayoría de los brotes de ETEC han sido vinculados al consumo de comida o agua contaminada. Usualmente es encontrada en las heces de pacientes asintomáticos, y los humanos aparentan ser la fuente más probable de ETEC, siendo la dosis infectiva igual a 10^8 UFC. Los brotes a causa de comida contaminada han ocurrido en restaurantes y en establecimientos públicos de comida. Ejemplos de esto han incluido alimentos como el queso tipo Brie, pavo con Curri, mayonesa, carne de cangrejo y ensaladas (FDA, 2012; Rodríguez, 2002).

2.9.2.2 *E. coli* Enteropatogénica (EPEC).

Es un bacilo con forma de barra recta, Gram negativo y se caracteriza por la presencia del locus para la isla de patogenicidad de borrado de enterocitos (LEE), que porta múltiples factores de virulencia, incluido el gen *eae* que codifica la proteína intimina y, junto con el gen *tir* (receptor de intimina), permiten la adherencia de EPEC a la pared epitelial intestinal, seguido de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/ E). (Eslava y col., 1994, Knutton y col., 1987). Fue el primero de los seis grupos en ser identificado serológicamente y fue asociado con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad.

Aunque los brotes son esporádicos, las fuentes y prevalencia de EPEC siguen siendo controversiales. En los últimos brotes los alimentos involucrados han sido, carne de res y pollo crudos, sin embargo cualquier alimentos expuesto a contaminación fecal es un potencial sospechoso. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (FDA, 2012, Rodríguez, 2002).

2.9.2.3 *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC).

También conocida como *E. coli* productora de Verotoxina, fue primero descrita en Canadá donde en algunas áreas rivalizaba con *Campylobacter* y *Salmonella* como la mayor causa de diarrea. *E. coli* O157:H7 es el serotipo de EHEC más comúnmente reportado, en el 75% de los casos reportados en E.U. AHEC ha captado la atención, no solo porque es más común transmitirlo que otras diarreas causadas por *E. coli*, sino porque la enfermedad que causa puede alcanzar desde una diarrea sin sangre, atravesando por una colitis hemorrágica, hasta el tratamiento del síndrome urémico hemolítico (Adams y Moss, 2008, FDA, 2012). Sin embargo, La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica así

como diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma (O'Brien y Holmes, 1987).

Un ejemplo relativamente reciente es el ocurrido en el 2011, que fue ubicado en Alemania, pero también afectó a otros países de la Unión Europea. El patógeno fue identificado como una cepa de *E. coli* de serotipo O104:H4 que produce la toxina Shiga y, por lo tanto, se pensó que era una EHEC. Al final, se resolvió que era un homólogo en un 93% con *E. coli* Enteroagregativa. En contra parte, Es importante el trabajo conjunto del laboratorio y los epidemiólogos para la vigilancia y detección oportuna de *E. coli* O157:H7 para prevenir posibles brotes en México, principalmente en zonas turísticas y fronterizas. Carne de res cruda o poco cocida y productos cárnicos en general son los vehículos más comúnmente implicados en los brotes de O157:H7. Los brotes tempranos también implican el consumo de leche bronca. O157:H7 puede desarrollar ácido-resistencia, y como evidencia están las infecciones ocasionadas por alimentos con pH<4.6. También se han hallado como fuentes de contaminación el agua potable (FDA, 2012).

2.9.2.4 *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC).

EIEC resulta en una infección de síntomas clásicos de una disentería bacilar normalmente asociada con *Shigella*. De igual forma a *Shigella*, EIEC invade y se multiplica a las celular epiteliales del colon causando ulceración e inflamación, aun así, EIEC no produce toxina Shiga. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, en forma de barra y comúnmente se confunde con *Shigella* por la no producción de descarboxilasa, no son móviles y son lactosa negativas (Adams y Moss, 2008, FDA, 2012). Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Eslava y col., 1994, Snyder, 1984). No hay alimentos frecuentemente asociados con infecciones de

EIEC. Los humanos infectados son el único reservorio conocido de EIEC; por lo tanto, cualquier comida contaminada con heces fecales humanas de un individuo enfermo de manera directa o indirecta puede ser infecciosa. De forma concreta, se muestran los virotipos antes mencionados en la tabla 6.

Tabla 6. Tabla de virotipos de *E. coli* relacionados con afecciones diarreicas. (Todar, 2007).

Nombre	Huésped	Descripción
ETEC	Humanos, cerdos, borregos, cabras, ganado, perros y caballos	Cepas no invasivas. Causa diarrea en niños, así como la diarrea de viajero. Produce enterotoxinas. 200 millones de casos de diarrea y 380, 000 muertes cada año (OMS).
EPEC	Humanos, conejos, perros, gatos y caballos	Tiene una colección de factores similares a <i>Shigella</i> . Moderadamente invasiva y provoca una respuesta inmunoinflamatoria.
EIEC	Humanos	Causa un síndrome idéntico al de <i>Shigella</i> con una diarrea abundante y fiebre alta.
EHEC	Humanos, ganado y cabras	El miembro más famoso de este virotipo es la cepa O157:H7, el cual causa diarrea con sangre sin fiebre. Puede causar el Síndrome Urémico Hemolítico y repentina falla del riñón. Moderadamente invasiva y posee la toxina Shiga que puede provocar un respuesta inflamatoria intensa

2.10 Antimicrobianos.

2.10.1 Cinamaldehído

Es el compuesto orgánico que le cede a la canela su olor y sabor. El mayor constituyente activo en la canela es el cinamaldehído. El cinamaldehído es usado en algunos perfumes y también es usado como saborizante en artículos de comida como goma de mascar, helados y bebidas. El cinamaldehído tiene varias propiedades medicinales tales como antipirético, astringente, actividad antimicrobiana, actividad anti-inflamatoria, efecto citotóxico y antibacterial. Puede ser usado como un fungicida (Nandam y col., 2012).

De fórmula molecular C_9H_8O y masa molecular 136.2 g/mol, el cinamaldehído se encuentra presente en la naturaleza como trans-cinamaldehído (Figura 7), y está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenilo; por ello, tiene aromaticidad. Tiene color amarillo pálido, y presenta una baja solubilidad en agua, siendo muy soluble en aceites.

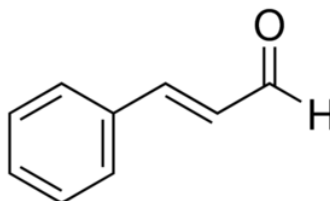


Figura 7. Estructura química del cinamaldehído. (Aelenei y col., 2016)

Yang y col. en el 2012 realizaron un estudio de la propiedades de la canela, comparando la actividad de los extractos procedentes de distintas partes de la *Cinnamomum cassia* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. La mayor actividad, con una CMI entre 0.3-0.7mg/L, fue encontrada en los brotes, siendo los compuestos responsables cinamaldehído, ometoxicinamaldehído, cumarina y eucaliptol. Las bacterias afectadas mostraban una serie de cambios morfológicos secuenciales: la adopción de una forma celular ovalada con arrugas (debido a la pérdida de material celular) precedía a la formación de agregados de células que habían perdido la integridad de su membrana (exhibiendo en ella material fibroso). Por ello se propuso que la acción del cinamaldehído y el resto de componentes activos en la canela ejercían su actividad antibacteriana mediante un mecanismo dependiente de su interacción con la

membrana. Parece ser que la acción antimicrobiana se debe a los fenoles presentes en la canela, que provocan la disrupción de la membrana celular.

2.10.2 Timol.

La mayoría de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especies y hierbas culinarias parece estar asociada con compuestos fenólicos (Bagamboula y col., 2004). El timol (5-metil-2-(1-metil-etil) fenol) es el mayor componente del tomillo (10-64%) y del orégano (hasta el 64%) (Charai y col., 1996). Su actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos está bien documentada en sistemas de modelo (Falcone y col., 2005) y comida, solo (Burt, 2004) o en combinación con bifidobacterias (Altieri y col., 2005) y solución electrolizada de NaCl (Mahmoud y col., 2006).

Tanto el timol como su homólogo el carvacrol también presente en el tomillo, tienen efectos antioxidantes y efectos antimutagénicos, al proteger al DNA de la oxidación. Estos efectos antioxidantes se deben a que el timol aumenta la producción de óxido nítrico, lo que mejora la función endotelica y previene contra la arteriosclerosis. La figura 8 muestra la molécula de timol.

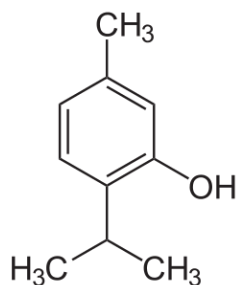


Figura 8. Estructura química del timol (Aelenei y col., 2016).

2.10.3 Carvacrol.

Es un aceite esencial componente del orégano, tomillo, mejorana y el sabor de verano (Arrebola y col., 1994; Lagouri y col., 1993). Generalmente reconocido como un aditivo seguro para la comida (Leriche y Carpentier, 1995), este fitoquímico es usado como un agente saborizante en muchos productos, tales como productos horneados, dulces, bebidas y goma de mascar (Fenaroli, 1995). El carvacrol también

es considerado como un antimicrobiano de amplio espectro, efectivo contra bacterias, hongos y levaduras (Beuchat, 1994; Davison y Naidu, 2000; Sivropoulou y col., 1996, Thompson, 1990). Patógenos, incluidos *S. aureus* y *S. enterica* serovar Typhimurium, son susceptibles al carvacrol, en la medida que este agente podría inactivar películas secas de estos patógenos en acero inoxidable (Knowles y Roller, 2001; Knowles, 2002). La figura 9 muestra la molécula de Carvacrol.

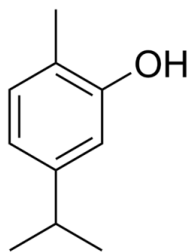


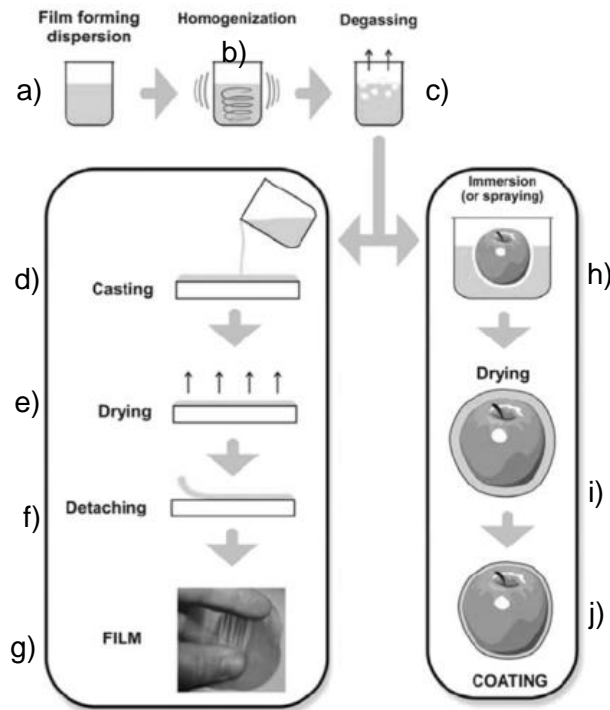
Figura 9. Estructura química del carvacrol (Aelenei y col., 2016).

2.11 Películas y recubrimientos comestibles.

Cuando el tejido de una fruta o vegetal es dañado, la humedad de la superficie y los restos citoplásmicos de la ruptura de las células con altas concentraciones de azúcar y proteínas será presentado, las cuales son condiciones ideales para el crecimiento microbiano (Saltveit, 1997). Este crecimiento microbiano podría causar enfermedades transmitidas por alimentos y el deterioro de los alimentos. (Nguyen y Carlin, 1994). Las películas para frutas y vegetales pueden ser producidas a partir de un solo tipo de macromolécula, mezcla o incluso multicompuestos (Macromoléculas, rellenos y/o aditivos funcionales). Pueden ser producidas por un simple o varios materiales para capas en función del desempeño que se quiera alcanzar (Otoni y col., 2017). La envoltura, cubierta o el rocío sobre los alimentos son formas de aplicar una película a nuestros alimentos (figura 10). Aunque algunas veces las películas y los recubrimientos son conocidos como sinónimos, pero al final son aplicados de manera distinta. Básicamente, los recubrimientos comestibles están formados directamente al rededor de la superficie del alimento, por inmersión, aplicados con spray o con brocha. En cambio las películas son estructuras formadas a parte y después son aplicadas en la superficie del alimento, formando parte del alimento o incluso sellado los productos en bolsas comestibles (Otoni y col., 2017). Estas películas o recubrimientos actúan como una barrera selectiva contra la transmisión

de gases, vapor y solutos que mejoran la calidad, extienden la vida útil y proporcionan protección física. Las películas hechas a base de proteínas de plantas y animales son desarrolladas usando su capacidad de formación de gel. (Zhong y Xia, 2007, Cuq y col., 1995). Los recursos proteicos derivados de animales, los cuales incluyen colágeno, gelatina, en determinado caso, proteína miofibrilar de pescado (FMP, por sus siglas en inglés) y proteína de suero, han sido usados tanto como aquellas de origen vegetal (Proteína de soya, maíz y trigo) (Kaewprachu y col., 2015).

Figura 10. Representación esquemática de la producción de películas y recubrimientos comestibles. a) Formación de la solución formadora de película. b) Homogenización. c) Desgasificación. d) Fundición o vertido. e) Secado. f) Desprendimiento. g) Formación de la película. h) Inmersión o rociado. i) Secado. j) Recubrimiento (Otoni y col., 2017).



2.11.1 Estructuración de las películas comestibles con base proteica.

Para la elaboración de las películas, el primer paso es la producción de una solución, dispersión o suspensión formadora de película. Todos los componentes deben estar íntimamente mezclados en función de obtener películas comestibles homogéneas. La mezcla apropiada de los componentes puede ser alcanzada a través de una agitación constante pero lenta, de velocidad lenta, de alta velocidad y

microfluidización de alta presión (Deng y Zhao, 2011; Wang y col., 2011; Shin y col., 2014).

Cuando una película es formada esto envuelve varias series de reacciones químicas complejas; estas también son influenciadas por las condiciones experimentales así como sus propiedades son dependientes de otros factores tales como el tipo de proteína y su concentración, los tipos de plastificantes y la concentración usadas así como lo marcado anteriormente, los factores externos (Kowalczyk y col., 2014). Dicha formación es principalmente llevada a cabo por desecación o evaporación del solvente de la solución formadora de película (SFP).

Durante el proceso de secado, macromoléculas se unen unas con otras en la matriz de la película, por medio de puentes de hidrógeno, uniones iónicas y uniones covalentes e hidrófobas. Las interacciones proteicas de cadena-cadena son afectadas por el grado de la extensión de la cadena y la naturaleza y secuencia de los residuos de aminoácidos (Kaewprachu y col., 2015). La modificación de la estructura de la proteína y las interacciones alrededor de las moléculas de proteína por el ajuste del pH o el calentamiento de la SFP pueden mejorar la formación de la película y sus propiedades (Kowalczyk y col., 2014). Tal es el caso de Kamal y col. que en el 2016 reportaron en su estudio que la SFP a base de proteína miofibrilla de pescado necesitó un ajuste del pH más alto o bajo que el punto isoeléctrico de la proteína para completar su solubilización, concluyendo que las propiedades de la proteína de miofibrilla de pescado son dependientes del pH de la SFP. Esto es explicado por Shiku y col. en el 2003, mencionando que a extremos ácidos o alcalinos de pH, hay una repulsión electrostática muy fuerte de grupo ionizados, llevando a la solubilización de la proteína; esto sería un prerrequisito para la formación de la película. Por otra parte, algunas soluciones formadoras de películas necesitan de calentamiento para mejorar sus propiedades antes del proceso de vertido.

Otro ejemplo de la necesidad de la alteración estructural de la proteína es el caso del suero proteico que requiere la desnaturalización de las proteínas para su óptima solubilización. Durante el tratamiento con calor, la proteína se desarrolla y revela

grupos sulfhidrilo internos que promueven la formación de puentes disulfuro intermoleculares. La formación de puentes disulfuro intermoleculares es el principal factor de la agregación irreversible en el caso del suero proteico. Esta agregación de proteína por entrecruzamiento o “*crosslinking*” intermolecular crea la red tridimensional y lleva al incremento de la cohesión estructural. Este entrecruzamiento es esencial para la formación de la película así como para sus propiedades mecánicas y de barrera (Zink y col., 2016). Por ende, es sabido que las películas hechas a base de proteína de diferentes tipos de proteínas requerirán distintas condiciones y producirán películas con diferentes propiedades (Kaewprachu y col., 2015).

2.11.2 Proteínas vegetales.

Generalmente, los frutos o vegetales son bajos en contenido proteico, con polisacáridos en abundancia, siendo el biopolímero predominante obtenido de estos recursos para la realización de películas y recubrimientos comestibles. Sin embargo, los granos además de cereales, tubérculos, leguminosas también legumbres poseen un alto contenido de proteínas comparado con las frutas así como los vegetales. De esta forma, estas proteínas han sido aisladas y estudiadas para la formación de películas (Dangaran y col., 2009).

Proteína de soya, es extraída de los granos o frijoles de soya durante la producción del aceite de soya. La harina de soya es un producto secundario y puede ser purificado para obtener un aislado de proteína de soya (SPI, por sus siglas en inglés) (Guerrero y col., 2011). El aislado de proteína de soya es una mezcla de diferentes proteínas que tienen diferentes propiedades moleculares. Aproximadamente el 90% de las proteínas de la soya son globulinas (Dangaran y col., 2009). Las globulinas son fracciones proteicas en las cuales las subunidades son asociadas por uniones hidrófobas y puentes de hidrógeno. En específico, las globulinas de la proteína de soya pueden ser fraccionadas en 2S, 7S, 11S y 15S de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación. Las fracciones 7S (β -coglicinina) así como la 11S (glicinina) conforman alrededor del 37% y el 31% del total de las proteínas extraídas además tienen la característica de polimerizar (Kinsella, 1979). Estructuralmente 7S y 11S

difieren en que mientras que 7S es extensamente glicosilada y consiste de 3 subunidades que resultan en diferentes formaciones de películas, los grupos sulfidrilo de la proteína 11S han sido reportadas como responsables de la formación de puentes disulfuro lo cual resulta en la formación de una red tridimensional (Cho y Rhee, 2004 y Sabato y col., 2001).

Proteína Zein de maíz, tiene algunas características únicas comparadas con la mayoría de las otras proteínas agrícolas usadas para la elaboración de películas comestibles. Esta proteína posee un alto porcentaje de aminoácidos no polares y bajas proporciones de aminoácidos básicos y ácidos. Los tres aminoácidos primarios en la proteína Zein de maíz son la glutamina (21-26%), leucina (20%) y prolina (10%). Consecuentemente, la proteína Zein es insoluble en agua, una característica que afecta las propiedades de barrera de sus películas. Una porción de esta proteína es la alfa-Zein, la cual es soluble en etanol al 95%, mientras que la otra porción, la beta-Zein es soluble en alcohol al 60% (Shukla y Cheryan, 2001). Cuando la proteína Zein forma películas son brillantes, resistentes a las grasas, con una baja permeabilidad de vapor de agua, comparada con otras películas de proteínas vegetales. Zein ha sido usado comercialmente en la formulación de tabletas, y tiene el potencial de ser usado en empaques biodegradables (Dangaran y col., 2009).

Proteína trigo, contiene gluten el cual aporta una pequeña porción de aminoácidos cargados (Lisina, histidina y arginina) y una alta porción de aminoácidos no polares, se agrega fácilmente debido a las interacciones hidrófobas. El gluten de trigo tiene 4 fracciones primarias, clasificados por su solubilidad: albumina (soluble en agua), globulinas (soluble en soluciones salinas diluidas), gliadinas (soluble en 70- 90% de etanol), y gluteina (insoluble en alguna de las condiciones antes mencionadas) (Haard y Chism, 1996).

La matriz proteica del gluten es también afectada por el corte, que hace que las proteínas se desdoblen, se formen puentes de hidrógeno, y un rearrreglo general de las proteínas para formar fibras paralelas. Estos cambios incrementan la elasticidad y el estiramiento de la matriz resultante. Durante la exposición a un estrés, hay áreas hidrófobas que son separadas para ser expuestas al agua dentro de la matriz de la

masa, llevando a un efecto hidrófobo y un reordenamiento de las moléculas de agua. Cuando el estrés es removido, las proteínas se relajan, y las áreas hidrófobas se reenvuelven, y el agua se vuelve menos estructurada. Por lo tanto, el gluten se considera tanto plástico como elástico (Dangaran y col., 2009).

Los requerimientos de barrera específicos y las especificaciones de los productos alimenticios determinaran el tipo de capa que es mejor para una situación dada. Hay que tomar en cuenta que una película comestible ideal debería tener las siguientes características:

1. No contener componentes tóxicos, alérgicos y no degradables.
2. Proveer estabilidad estructural y prevenir daño mecánico durante la transportación, manejo, y exhibición.
3. Tener una buena adhesión a la superficie del alimento a proteger proviendo una cobertura uniforme.
4. Controlar la migración de agua dentro y fuera del alimento protegido para mantener el contenido de humedad deseado.
5. Proveer semi-permeabilidad para mantener el equilibrio interno de gases involucrados en la respiración aerobia y anaerobia, y así retardar el envejecimiento.
6. Prevenir la pérdida o salida de componentes que estabilizan aroma, sabor, características nutricionales y organolépticas necesarias para la aceptación del consumidor sin alterar el sabor o la apariencia.
7. Proveer estabilidad bioquímica y microbiológica de la superficie mientras protege contra la contaminación, infestación por plagas, proliferación microbiana y otros tipos de deterioro.
8. Mantener y mejorar la estética y atributos sensoriales (apariencia, sabor, etc.) del producto.

9. Servir como transportador para aditivos deseables tales como sabor, fragancia, color, nutrientes, y vitaminas. La incorporación de antioxidantes y agentes antimicrobianos puede estar limitada a la superficie mediante el uso de películas comestibles, y así minimizar costos y sabores no deseados.
10. Por último pero no menos importante- ser fácilmente manufacturada y económicamente viables (Pavlath y Orts, 2009).

2.11.3 Películas y su asociación con antimicrobianos de origen natural

Las películas comestibles pueden servir como portadores de una amplia gama de aditivos comestibles, incluyendo varios tipos de antimicrobianos que pueden extender la vida útil del producto y reducir el riesgo del crecimiento de patógenos en las superficies de los alimentos. Algunos de los conservadores y antimicrobianos más utilizados son los benzoatos, propionatos, sorbatos, parabenos y agentes acidificantes (por ejemplo, ácido acético y ácido láctico), agentes curantes (por ejemplo, cloruro de sodio y nitrato de sodio), bacteriocinas y conservadores naturales (por ejemplo, aceites esenciales, lisozimas, ahumado líquido) (Cagri y col., 2004).

Los aceites esenciales son responsables del olor, aroma además de sabor de las especies y hierbas. Estos componentes pueden ser adicionados a las películas comestibles para modificar el sabor, el aroma así como el olor y para introducir propiedades antimicrobianas. Sin embargo el uso de estos aceites como aditivos de la comida es limitado por su fuerte sabor. Estos extractos contienen mayormente compuestos fenólicos tales como abietan diterpenos (Moujir y col., 1993), carnosol y ácido ursólico, los cuales presumiblemente son responsables de su acción antimicrobiana.

El control de los patógenos transmitidos por comida tales como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium han recibido una gran atención porque estos organismos pueden formar biofilms elásticos en una variedad de superficies (Gayford y Richards, 1970; Hood y Zottola, 1997). La erradicación usualmente requiere el uso de detergentes alcalinos o ácidos y/o iodoforos (Corrieu, 1981). A pesar de su eficacia, problemas tales como la corrosión, la contaminación

del producto, y la toxicidad, combinada con la rápida emergencia de especies microbianas resistentes, limita el uso de estos compuestos. El uso de estos agentes antimicrobianos naturales puede ser una alternativa efectiva o un suplemento para el control de microorganismos (Naidu, 2000; Roller, 2003).

Entre las sustancias presentes en los aceites esenciales de hierbas y especias, se encuentran diversos compuestos fenólicos como es el caso del carvacrol y timol, que poseen actividad antifúngica y antibacteriana. Estos compuestos han sido probados en diferentes microorganismos de importancias en alimentos como por ejemplo: *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thiphymurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio vulnificus*, y *Bacillus cereus*, entre otros (Ultee y col., 1998).

Los estudios demuestran que el carvacrol y timol tienen varios sitios de acción dentro de las células además dependiendo de las concentraciones utilizadas pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Eklund, 1989). Los blancos o puntos de ataque de estos agentes antimicrobianos dentro de las células incluyen la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistema genético (Davison y Branen, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN.

A nivel global, de la mano con la súbita modernización y concientización de los buenos hábitos alimenticios la demanda de alimentos inocuos y saludables se ha incrementado de manera exponencial. Por otra parte, esta demanda masiva de productos conlleva la preocupación de las personas por saber si sus alimentos son un riesgo potencial para su salud. Esto genera un reto para la investigación en el área de los alimentos de manera que los hallazgos provenientes de estos estudios aseguren la calidad de los productos que consume la población.

Las alternativas presentadas a lo largo del desarrollo en la conservación de los alimentos han desembocado en una repercusión para el medio ambiente y en enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos mal conservados. Las películas comestibles han venido a refrescar la forma en que se alarga la vida útil de los productos, conformando así una alternativa que ofrece una mejora a los productos en sus características sensitivas, con la ventaja del aseguramiento de la inocuidad alimentaria, y a su vez establece un precedente el cual se espera sea estudiado en sus diferentes atributos y propiedades.

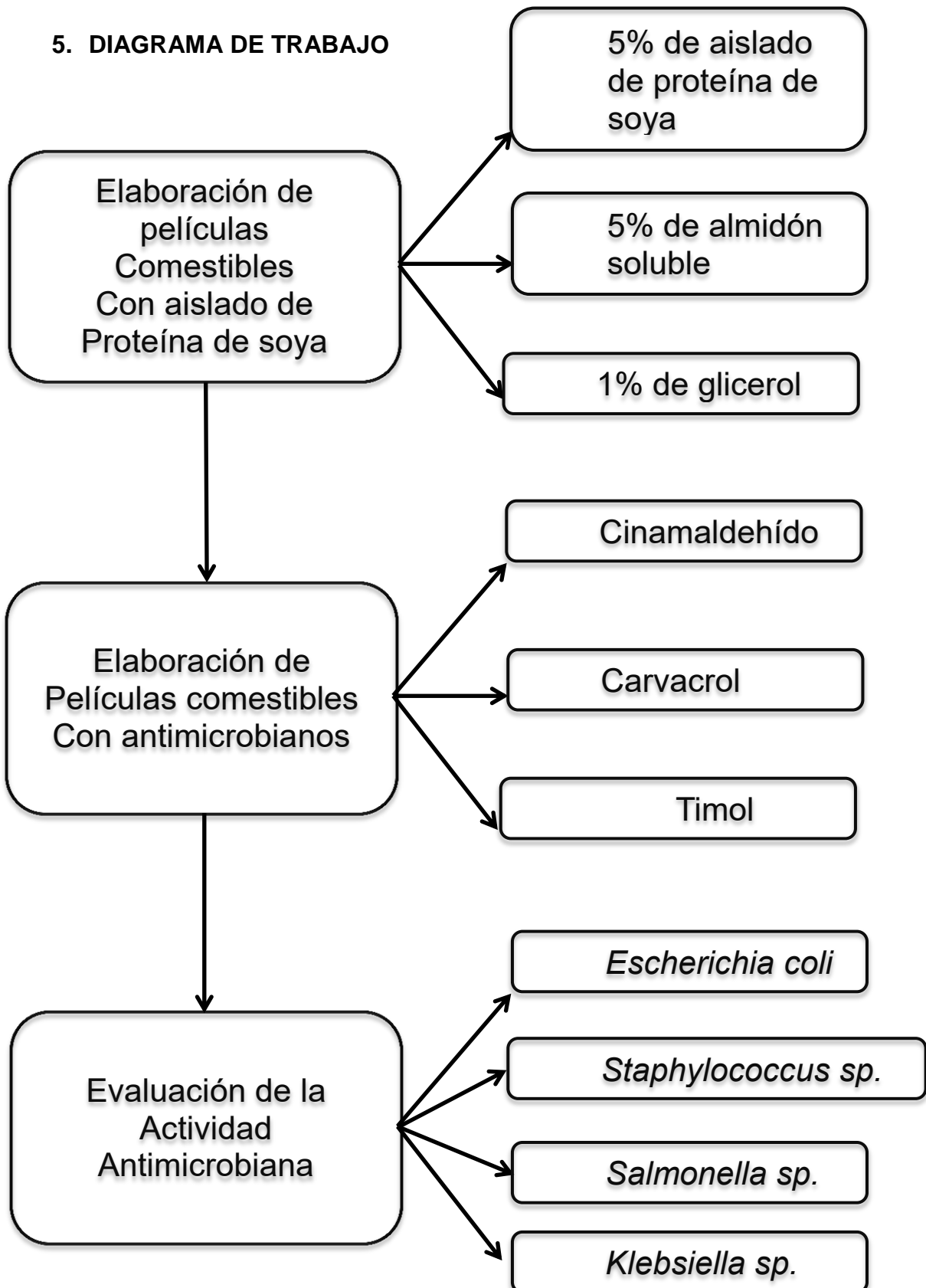
4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Klebsiella sp.* en películas comestibles con aislado de proteína de soya adicionada con antimicrobianos de origen natural.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Elaborar películas comestibles con aislados de proteína de soya.
- b) Adicionar a las películas comestibles elaboradas, antimicrobianos de origen natural (Timol, Carvacrol y Cinamaldehído).
- c) Evaluar la capacidad antimicrobiana de la películas en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Klebsiella sp.*

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

- Reactivos y material de vidrio grado analítico necesarios para cada determinación.
- Cepa de: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.*

Tabla 7. Métodos y referencias

Determinación	Técnica	Referencia
Determinación de la capacidad antimicrobiana	Conteo de Bacterias mesofílicas aerobias.	Camacho y col., 2009
Formación de películas comestibles	Sensibilidad a la humedad, Propiedades ópticas, mecánicas y estructurales de las películas comestibles.	Galus y Kadzinska. 2015

Tabla 8. Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Espectrofotómetro	Spectronic Instruments	Spectronic 20 Genesys
Campana de Flujo Laminar Vertical	Prendo	CFLV-102
Estufa de Cultivo	Equipos de Laboratorio BG	E-41
Desecador por Convección	L MIM	No especificado

7. METODOLOGÍA

El trabajo realizado se dividió en 3 etapas principales. Todo el proceso se manejó en condiciones de esterilidad y material debidamente esterilizado, alternando los pasos que se manejaban en presencia de mecheros con los pasos que pudieran ser ejecutados dentro de la campana de flujo laminar, para mantener el grado de esterilidad necesario para evitar interferencias externas en nuestro conteo final.

7.1 Primera etapa.

Se empezó por incorporar en un matraz de volumen medio el aislado de proteína de soya en una concentración del 5%, almidón soluble 5% y glicerol 1% (con respecto al volumen total), solubilizando estos componentes en agua destilada. Esta solución fue agitada con ayuda de una barra de agitación magnética durante un lapso de 30 minutos en condiciones ambientales. Partiendo de un pH inicial igual a 6.49 se modificó el pH haciendo uso de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 2N hasta ajustar un pH igual a 12. Se calentó el contenido a una temperatura de 80°C por 30 minutos con agitación constante. Pasado el periodo de agitación la solución se enfrió a temperatura ambiente para modificar el pH una vez más, pero en esta ocasión haciendo uso de una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) en una concentración de 2N para ajustar el pH a 5.5. Esta solución fue agitada 5 minutos más y finalmente separada en 4 matraces en volúmenes iguales.

7.2 Segunda etapa.

Utilizando los 4 volúmenes conocidos se realizaron los cálculos de concentración/volumen para conseguir 4, 000 ppm en 3 de los 4 matraces, los correspondientes a timol, carvacrol y cinamaldehído, dejando el cuarto matraz como control del estudio. Se tomó como concentración inicial para los cálculos, la correspondiente a los antimicrobianos en dilución madre (Timol=100, 000 ppm, carvacrol= 100,000 ppm y cinamaldehído=100,000 ppm).

El contenido de los matraces fue previamente enfriado para poder continuar con la adición de los componentes de origen natural, y así evitar la modificación molecular

de estos. Se agitaron los matraces por 5 minutos más. Las cantidades medidas de 5ml de la solución formadora de película fueron vertidas en placas de silicón con teflón (rotuladas para su diferenciación). Se continuó con la ubicación de las placas en charolas de acero inoxidable, colocando también placas de Petri llenas de perlas de sílica (Óxido de Sílice), en una proporción de 1 placa grande de sílica por cada 4 placas con la solución, siendo estas charolas posteriormente sometidas a condiciones de 35 +/-2°C en el desecador por convección por 24 +/- 1 horas. Esta etapa dio como resultado la formación de las películas comestibles.

7.3 Tercera etapa.

La mayor parte de esta etapa se realizó en la campana de flujo laminar y considerando el riesgo de que existiera un cruce de cepas, el ensayo de cada cepa se llevó a cabo de manera independiente así como en diferente día. Se empezó por preparar una solución a 0.5 en la escala de McFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) de la primera cepa, esta concentración se consiguió pasando colonias puras de microorganismos en agar nutritivo a solución salina isotónica para su posterior lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625nm hasta alcanzar una absorbancia entre 0.08 – 0.1. Se hizo una dilución 1:2 para conformar una concentración aproximada de 1.5×10^4 UFC/mL, que se utilizó como concentración inicial de microorganismos así como parámetro de inhibición de las películas comestibles. 4 películas correspondientes a timol, carvacrol, cinamaldehído y control se pasaron a placas pequeñas de Petri, fueron inoculadas por estría masiva con 50µL de la dilución 1:2 de microorganismos. Las placas se metieron a la estufa microbiológica en condiciones de 36 °C por 24h.

Al día siguiente se realizó la técnica de conteo de bacterias mesofílicas aerobias por vertido en placa, utilizando como materia de análisis las películas incubadas. Se empezó por pesar 0.2g de la película en una balanza analítica en zona de esterilidad, se añadieron 1.8mL de solución de agua peptonada a la caja de Petri, conformando así la relación 1:10 de nuestra primera dilución, dicha caja se agitó manualmente por 40 segundos. Esto fue seguido de las diluciones en tubos en la misma proporción, hasta completar 7. Se vertió 1mL de cada dilución y el agar cuenta estándar en

placas grandes de plástico, aplicando homogenización en las placas mediante agitación manual. Una vez solidificadas, las placas fueron incubadas a 36°C por 24h. Haciendo uso de un contador de colonias, se eligieron las cajas contables correspondientes a cada película, a partir de estos conteos y sus respectivas relaciones de dilución fueron calculadas las Unidades Formadoras de Colonias aproximadas por gramo de película.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las películas hechas con aislado de proteína de soya-almidón resultan ser de fácil manejo tanto al momento de desprenderlas del recipiente de secado como al manipularlas. La adición de compuestos de origen natural utilizados, aceites esenciales como el carvacrol, cinamaldehído y timol, deducen una mejora en apariencia de las películas. Se obtuvieron películas de color amarillento, semi-translucidas, flexibles y de difícil fractura, con olor agregado por los aceites esenciales y olor a soya en el caso del control además de un grosor aproximado de 0.5- 1mm, pueden ser observadas en la figura 11. Una vez que se lograba bajar el pH de la solución formadora de películas y se obtiene el pH ideal para el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales, el olor de la solución formadora de películas es irritante debido a la modificación estructural de las proteínas, siendo liberados grupos amino como resultado de la reacción. Al agregar los antimicrobianos de origen natural el olor y color de las soluciones formadores de películas fueron modificados, adquiriendo los olores para cada aceite esencial. Al modificar las condiciones de crecimiento de los microorganismos, tales como la adición de aceites esenciales en el medio de crecimiento que fueron las películas comestibles, las repercusiones en el comportamiento y crecimiento de los microorganismos no fueron uniformes. Son las bacterias Gram negativas en las que hay un efecto de inhibición total (*Salmonella*) y lo que para efectos de esta investigación es denominada como *inhibición parcial* (*Klebsiella*). Una de las bacterias con mayor repercusión en el manejo higiénico de los alimentos es *Staphylococcus aureus* y que a pesar de que en la bibliografía refieran un efecto de inhibición de los aceites esenciales sobre las bacterias Gram positivas, en los ensayos presentados no se reprodujo dicho efecto y, por el contrario, se encontró un efecto parecido al enriquecimiento sobre el microorganismo. Los resultados hallados en el caso de *E. coli* (bacteria que es indicadora de las buenas prácticas higiénicas) se obtienen resultados positivos para inhibición en uno de los ensayos (ensayo con carvacrol). Los detalles de los resultados para cada bacteria son analizados en las tablas 9, 10, 11 y 12.

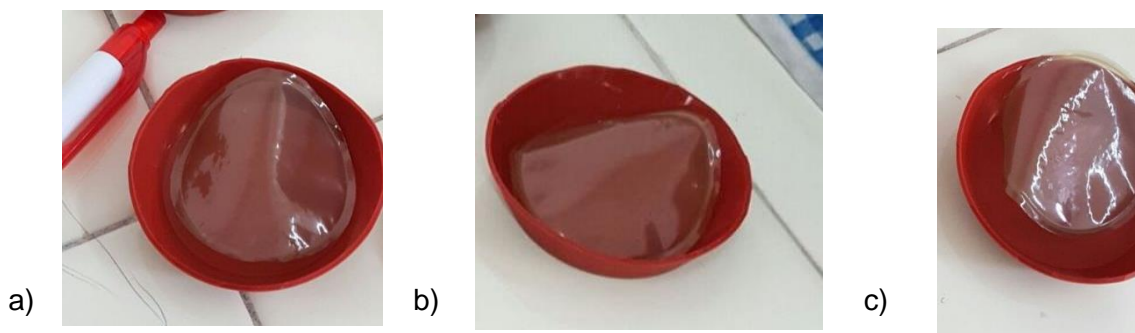


Figura 11. Películas comestibles adicionadas con antimicrobianos. a) Película adicionada con cinamaldehído; b) Película adicionada con carvacrol; c) Película adicionada con timol.

La tabla 9 muestra los resultados de las películas con *E. coli* de los cuales en la película añadida con Carvacrol como antimicrobiano coinciden con lo que reporta Burt y col. en el 2007 cuando ellos probaron una concentración de 5mM de antimicrobiano donde notaron el cese de la motilidad bacteriana, así como el registro de la muerte celular. De igual forma es confirmado en esta investigación que el carvacrol inhibe el 100% del crecimiento bacteriano y aún más, es factible su asociación con una formulación de aislado de proteína de soya-almidón para la formación de películas en una concentración de 4,000ppm. En contraposición *E. coli* en las películas con timol y cinamaldehído refleja un comportamiento de enriquecimiento bacteriano. Chavez y col. en 2008; D'antuono y col. en 2000; Veres y col. en 2007 y Zhang y col. en el 2015, estudiaron la exposición de *E. coli* a diferentes concentraciones de timol y carvacrol donde las investigaciones coincidieron en el 100% de inhibición del microorganismo.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición y crecimiento de *E. coli* en presencia de películas comestibles de aislado de proteína de soya-almidón adicionadas con timol, carvacrol y cinamaldehído.

Antimicrobiano	Concentración (ppm)	UFC /g película	% de inhibición	% de crecimiento
Control	0	14.4x10 ³	0	44
Carvacrol	4,000	NC*	100	0
Cinamaldehído	4,000	17.1 x10 ³	0	71
Timol	4,000	84.6 x10 ³	0	746.5

*NC: no crecimiento.

Klebsiella sp; grupo poco usual en la industria alimentaria al ser una bacteria nosocomial resulta tener crecimiento en presencia de los antimicrobianos, se explica por la multiresistencia a antimicrobianos de grado farmacéutico que es alcanzada en hospitales y centros del cuidado de la salud (Singh y Harsh 2011). En la tabla 10 se observa que las cuatro películas actúan como medio de enriquecimiento para *Klebsiella sp*. recuperando porcentajes positivos a crecimiento bacteriano. Los aceites esenciales en películas de soya-almidón no generan porcentaje de inhibición de *Klebsiella sp*. pero comparando los resultados con la película control existe una disminución significativa del crecimiento bacteriano. Concordante con lo investigado por Aelenei y col. (2016) cuando estudiaron los efectos de aceites esenciales en *K. pneumonie*. concluyendo que aceites como carvacrol debieron ser mezclados con antibióticos farmacéuticos para poder conseguir una mejor efectividad, ya que por sí solo no alcanzaba la inhibición de *Klebsiella pneumonie*.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición y crecimiento de *Klebsiella sp*. en presencia de películas comestibles de aislado de proteína de soya-almidón adicionadas con timol, carvacrol y cinamaldehído.

Antimicrobiano	Concentración (ppm)	UFC /g película	% de inhibición	% de crecimiento
Control	0	33 x10 ⁴	0	3, 200
Carvacrol	4,000	72.2 x10 ³	0	622.4
Cinamaldehído	4,000	69.4 x10 ³	0	594.4
Timol	4,000	28 x10 ⁴	0	180

Salmonella sp; en estos ensayos se ha comportado como lo esperado siendo inhibida por aceites esenciales. En la tabla 11 se muestra 100% de inhibición de *Salmonella* con carvacrol y cinamaldehído a 4, 000ppm en la película con aislado de proteína de soya-almidón, así como fue reportado en los estudios de García y col. en el 2005 y lo investigado por Zhang y col. en 2015 donde tanto carvacrol como cinamaldehído son una alternativa antimicrobiana contra el crecimiento del microorganismo. *Salmonella* estuvo en una superficie propicia para su crecimiento en la película adicionada con timol, opuesto a lo investigado por Amaral y col. (2015) con películas de polipropileno adicionadas con timol y carvacrol inoculadas con cepas de *Salmonella* encontrado inhibición y *subinhibición*.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición y crecimiento de *Salmonella sp.* en presencia de películas comestibles de aislado de proteína de soya-almidón adicionadas con timol, carvacrol y cinamaldehído.

Antimicrobiano	Concentración (ppm)	UFC /g película	% de inhibición	% de crecimiento
Control	0	23 x10 ³	0	130
Carvacrol	4,000	NC*	100	0
Cinamaldehído	4,000	NC*	100	0
Timol	4,000	56 x10 ³	0	460

*NC: no crecimiento.

Lambert y col. (2001) reportaron la efectividad de Timol y Carvacrol en cepas de *S. aureus*, en 1989 Chen y col. comprobaron la efectividad del cinamaldehído en cepas de *S. aureus*. en contraposición en los resultados obtenidos en esta investigación no se replicó la eficacia de las combinaciones de los antimicrobianos con películas comestibles (Tabla 12). Esto se explica por algún cambio en la estructura de los antimicrobianos debido a los cambios del medio de disolución, tales como el cambio del pH de efectividad del aceite esencial o bien una reacción de un grupo reactivo de la molécula con la estructura tanto de la proteína de soya o el almidón (Kowalczyk y col., 2014), impidiendo la acción de desestabilizar la membrana celular, o bien los cambios estructurales de las proteínas resultantes de las alteraciones del medio exponen grupos ricos en nitrógeno que *S. aureus* puede usar como material metabólico; tomando en consideración que las condiciones de temperatura de la solución formadora de película, concentración de aceite y semi-solubilidad en agua estaban ponderadas, las películas de soya-almidón son una superficie de crecimiento además de enriquecimiento para *Staphylococcus aureus*.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición y crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de películas comestibles de aislado de proteína de soya-almidón adicionadas con timol, carvacrol y cinamaldehído.

Antimicrobiano	Concentración (ppm)	UFC /g película	% de inhibición	% de crecimiento
Control	0	66 x10 ³	0	560
Carvacrol	4,000	24.5 x10 ⁵	0	24, 400
Cinamaldehído	4,000	35.5 x10 ⁵	0	35, 400
Timol	4,000	24.1 x10 ⁵	0	24, 000

9. CONCLUSIONES.

- ✓ Fueron formadas películas a base de aislado de proteína de soya-almidón modificando el pH de estabilidad, condiciones de secado y añadiéndoles otras bases poliméricas como el almidón soluble.
- ✓ Son formadas películas de soya- almidón muy flexibles utilizando una combinación de aislado de proteína de soya-almidón con aceites esenciales de timol, carvacrol y cinamaldehído.
- ✓ Los aceites esenciales utilizados son efectivos en la inhibición de *E. coli* en presencia de carvacrol así como con *Salmonella sp.* en presencia de carvacrol y cinamaldehído. Por el contrario, *Klebsiella sp.* y *Staphylococcus aureus* son resistentes los antimicrobianos adicionados a las películas.

10. SUGERENCIAS.

- Probar la mezcla de la solución formadora de películas con diferentes aceites esenciales.
- Evaluar las películas modificando las proporciones de bases poliméricas y esperar un mejor resultado e interacción con los antimicrobianos.
- Probar la adición de compuestos diferentes a antimicrobianos, tales como antioxidantes.
- Estudiar otros atributos de estas películas como su permeabilidad a los gases, propiedades mecánicas, estabilidad en el transcurso del tiempo e incluso el estudio en la aceptación por parte de un panel sensorial.
- Estudiar a profundidad el comportamiento de los polímeros proteicos en solución con los antimicrobianos y de esta forma comprender mejor cómo interactúan unos con otros, con la finalidad de conseguir la formación de una película efectiva hecha en su totalidad de aislado de proteína de soya.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S. (2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, y Serratia*. In, Murray PR (Ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington DC. 9th ed. 698-711. 2007 Washington, USA: ASM Press.
- Adams, M. y Moss, M. (2008). *Food Microbiology*. University of Surrey, Guilfor. Third Edition. The Royal Society of Chemistry. United Kingdom.
- Aelenei, P., Miron, A., Trifan, A., Gille, E. y Aprostosoai, A. (2016). Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Medicines* 2016, 3, 19; doi:10.3390/medicines3030019.
- Altieri, C., B. Speranza, M. A. Del Nobile, y M. Sinigaglia. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf-life of fresh packed pance fillets. *Journal of Applied Microbiology* 2005, 99, 1294–1302.
- Alvarez, R. (2012). *Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabólica y evaluación de la calidad poscosecha*. Doctorado en Ciencia Farmaceuticas y Alimentarias: Bioorgánica. Medellín, Colombia. 2012.
- Amaral, V. C., Santos, P. R., da Silva, A. F., dos Santos, A. R., Machinski, M. y Mikcha, J. (2015). Effect of carvacrol and thymol on *Salmonella* spp. biofilms on polypropylene. *International Journal of Food Science & Technology* Volume 50, Issue 12.
- Arrebola, M. L., M. C. Navarro, J. Jimenez, y F. A. Ocana. (1994). Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. *Phytochemistry. Journal of Phytochemistry*. 36 Issue 67-72.
- Aydin, A., Sudagidan, M. y Muratoglu, K. (2011). Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*.

- Barón, A. (2005) Historia de la conservación de los alimentos. En J. Salas Salvadó, P. García Lorda, J.M. Sánchez Ripollés (Eds.), La alimentación y la nutrición a través de la historia.
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., y Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cimene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33–42.
- Barbosa, V., Fontana, A., Schmidt, S., y Labuza, T. (2008). *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell Publishing
- Bello, J. (2000). Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos. Ed. Díaz de Santos. Recuperado de: <http://www.diazsantos.es>
- Beuchat, L. R. (1994). Antimicrobial properties of spices and their essential oils, p. 167–179. In V. M. Dillon and R. G. Board (ed.), *Natural antimicrobial systems and food preservation*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Brother, G. (1940). Casein plastics. *Ind Eng Chem January* 32 (1) : 31 – 34
Cagri A , Ustunol Z , Ryser ET (2004) Antimicrobial edible films and coatings . *J Food Protection*. 67 (4): 833 – 848.
- Bumann, D. y Schorhorst, J. (2017). Intracellular *Salmonella* metabolism. *Cellular Microbiology*. Volume 19, Issue 10. June, 2017. Vol. 94, Issue 3. Pages 223-253.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*
- Burt, S. A., Van der Zee, R., Koets, Ad. P., De Graaff, A. M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. A. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* o157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 73, Pages 4484-4490.

- Cagri, A., Ustunol, Z., y Ryser, E. (2004) Antimicrobial Edible Films and Coatings. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 4, 2004, Pages 833–848.
- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. (2009). *Técnicas para el análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Charai, M., M. Mosaddak, y M, Faid. (1996). Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *J. Essential Oil Res.*
- Chávez, L., Díaz, M., Escalante, G. y Estrada, E. (2008). Synergic effect of *Origanum vulgare* essential oil to Gentamicin on *Escherichia coli* isolates. Universidad Nacional Federico Villareal, Lima, Perú.
- Chen, C., Lin, C. y Namba, T. (1989) Screening of Taiwanese crude drugs for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *J Ethnopharmacol* 27, 285–295.
- Cho, S. Y. y Rhee, C. (2004). Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *LWT-Food Sci. Technol.*, Vol. 37. Page 833.
- Clarke, R.C. y Gyles, C.L. (1993) *Salmonella*. In: Gyles, C.L., Thoen, C.O., editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Corrieu, G. (1981). State of the art of cleaning surfaces, p. 90–114. In B. Hallstrom, B. D. Lund, and C. Tragardh (ed.), *Fundamentals and applications of surface phenomena associated with fouling and cleaning in food processing*, Lund University, Lund, Sweden.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L., y Guilbert, S. 1995. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: Formulation and functional properties. *J. Food Sci.*, 60, 1369-74

- Cuq, B., Gontard, N. y Guilbert, S. (1998). Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. *Cereal Chemistry*. 75(1): 1-9
- D'antuono, L.F., Galletti, G. y Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area (Liguria region, north Italy). *Ann. Bot.*
- Dangan, K., Tomasula, P. y Qi, P. (2009) Edible films and coatings for food application. Chapter 2: Structure and function of protein-based edible films and coatings. Ed. Springer. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Kerry_Huber/publication/253174398_Edible_Films_and_Coatings_for_Food_Applications/links/55eb577e08ae21d099c5e81f/Edible-Films-and-Coatings-for-Food-Applications.pdf
- Davidson, P. M. y A. S. Naidu. (2000). Phytochemicals, p. 265–294. In A. S. Naidu (ed.), *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Davidson, P.M. y Branen, A.L. (1993). *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Deng, Q. y Zhao, Y. 2011. Physicochemical, nutritional, and antimicrobial properties of wine grape (cv. Merlot) pomace extract-based films. *J Food Sci* 76(3):E309–17.
- Díaz, L., Terifa, P., Olivera, S., Gerje, F., Benítez, M. y Ercoli, P. (2014). *Alimentos: Historia, Presente y Futuro*. 1ª Ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Doyle M.P. y Padhyem VV. (1989). *Escherichia coli*. In: Doyle MP, editor. *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Eklund, T. (1989). *Organic Acids and Esters*. En: G.W. Gould (Ed). *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science Londres.

- Elika. (2018). Higiene Alimentaria: Alteración de los Alimentos. Elika, Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. http://www.elika.eus/es/industria_alimentaria_cursos_detalle.asp?id=2. 07/Abr/2018.
- Eslava. C., Mateo, J. y Cravioto, A. (1994). Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México. 25.
- Faber, F., Thiennimitr, P., Spiga, L., Byndloss, M. X., Litvak, Y., Lawhon, S. y Bäumlér, A. J. (2017). Respiration of microbiota-derived 1,2- propanediol drives Salmonella expansion during colitis. PLoS Pathogens. 2017 Jan; 13(1): e1006129. Published online 2017 Jan 5. doi: 10.1371/journal.ppat.1006129
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R. y Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. Journal of Food Protection: August 2005, Vol. 68, No. 8, pp. 1664-1670.
- Fenaroli, G. (1995). Fenaroli's handbook of flavor ingredients, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- FDA (2012) Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, 2nd ed, US Food and Drug Administration, Silver Spring.
- FDA. (2013). FDA Food Code. U.S. Department of Health and Human Services. College Park, MD
- Flatamico, P. y Smith, J. (2006). Escherichia coli infections. In: Riemann H, Cliver D, editors. Food Infection and Intoxication. Elsevier Inc.
- Freitas, C. G., Santana, A.P., Silva, P.H., Goncalves, V.S.P., Barros, M., Torres, F.A.G., Murata, L.S. y Perecmanis, S. (2010). PCR multiplex for

detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat, International Journal of Food Microbiology, Vol.139, No. 1-2.

- Galus, S. y Kadzinska, J. (2015). Whey protein Edible Films Modified With Almond and Walnut oils. Food Hydrocoll. 52,78-86.
- García, R. M. (2005). Agentes bactericidas / bacteriostáticos a partir de sorbato de potasio, carvacrol y timol. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Gayford, C. G. y J. P. Richards. (1970). Isolation and enumeration of aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. J. Appl. Bacteriol. Volume 33, Issue 2. June 1970. Pages 342–350
- George, M. y Garrity. (2005). “The Gammaproteobacteria”, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2B (2nd ed.), New York, Springer, pp. 1108, ISBN 978-0-387-24144-9.
- Gettens, R. y Stout, G. (1984). Painting Materials: A Short Encyclopedia . Courier Dover Publications , New York, NY
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. y Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. International Journal of Food Science & Technology. Volume 29, Issue 1. February 1994. Pages 39–50.
- Gordon, L. (2005). Food Packaging: Principles and Practice. 2nd Ed. Taylor and Francis Group.
- Graaf, L. y Kolster, P. (1998). Industrial Proteins as Green Alternative for “petro”polymers: Potentials and Limitations. *Macro-Molecular Symposia* 127, p. 51.
- Guerrero, P., Stefani, P., Ruseckaite, R. y de la Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. J. Food Eng. 105, 65–72.

- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films, in food packaging and preservation: theory and practice , M. Mathlouthi. Elsevier applied science publishing co. Volume 8, Issue 6. November/December 1995. Pages 339–346
- Haard, N.F. y Chism, G.W. (1996) Characteristics of edible plant tissue . In: Fennema O (ed) Food Chemistry. Marcel Dekker , New York , NY , p 1067
- Hatakka, M., Bjorkroth, K.J., Asplund, K., Maki-Petays, N. y Korkeala, H.J. (2000) Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flightcatering employees. Journal of Food Protection 63.
- Herrera, L. y Troyo, J. (2011). Manipulación de Alimentos. Instituta Nacional de Aprendizaje. Alajuela, Costa Rica.
- Hood, S. y Zottola, E. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. Int. Journal Food Microbiology. 37(2-3):145-53. 1997 Jul.
- ICMSF (1996) *Staphylococcus aureus*. Ch 17 In: Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and Professional, London.
- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., y Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* Pan-genome. *Microbial Ecology*, 62(3), 487–504. <http://doi.org/10.1007/s00248-011-9880-1>
- Kamal, R., Kakatkar, A., y Karani, M. (2016). Development of Protein-based Biodegradable Films from Fish Processing Waste. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ISSN: 2319-7706 Volume 5 Number 8. pp. 878-888.
- Kaewprachu, P., Osako, K., Benjakul, S., Tongdeesoontorn, W. y Rawdkuen, S. (2015). Biodegradable Protein-based Films and Their Properties: A

Comparative Study. Packaging Technology and Science. 29. n/a-n/a. 10.1002/pts.2183.

- Kamran, M., Samreen, Z., Xiu, J., Taj, I., Hassani, M. y Yunlin, W. (2014). Escherichia Coli As A Model Organism. International Journal of Engineering Research and Science & Technology. Vol. 3, No. 2, May 2014.
- Kinsella, J. (1979). Functional properties of soy proteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 242–258.
- Knowles, J. R. (2002). Microbial adhesion and its control using natural and synthetic biocides. Ph.D. thesis. South Bank University, London, United Kingdom.
- Knowles, J. R. y Roller, S. (2001). Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspensión and adhered to stainless steel. J. Food Prot. 64.
- Knutton, S., Lloyd, D.R. y Mc Neish, A.S. (1987). Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun. 55.
- Kowalczyk, D., Gustaw, W., Świeca, M. y Baraniak, B. (2014) A study on the mechanical properties of pea protein isolate films. Journal of Food Processing and Preservation 2014; 38: 1726–36. DOI:10.1111/jfpp.12135.
- Krochta, J. y Mulder, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Scientific Status Summary. Vol. 51. No 22. February 1997.
- Lagouri, V., G. Blekas, M. Tsimidou, S. Kokkini, y Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. Z. Lebens. Unter. Fors.
- Lambert, R., Skendamis, P., Coote, P. y Nychas, G. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil,

thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 91, Issue 3 September 2001. Pages 453–462.

- Leriche, V. y B. Carpentier. (1995). Viable but non-culturable *Salmonella* Typhimurium in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J. Food Prot.*
- Lin, J.C., Chang, F.Y., Fung, C.P., Xu, J.Z., Cheng, H.P., Wang, J.J., Huang, L.Y. y Siu, L.K. (2004). High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. *Microbes Infect*
- Mahmoud, B.S. (2012). *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. InTech. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. Recuperado de: <https://library.umac.mo/ebooks/b28055688.pdf>
- Mahmoud, B. S., Yamazaki, K., Miyashita, K., Kawai, Y., Shin, I. S. y Suzuki. T. (2006). Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during conventional air-drying. *Int. J. Food Microbiol.*
- Martins, S., Jorgen, W. y van Boekel, M. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 11 Pages 364–373
- McCoy, E. y McClung, L. (1939). *The Anaerobic Bacteria and Their Activities in Nature And Disease*. Vol. 2. University of California Press. Berkeley, Cal.
- Meng, J. y Schroeder, C.M. (2007). *Escherichia coli*. In: Simjee S, editor. *Foodborne diseases*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Monahan, L. G., y Harry, E. J. (2016). You are what you eat: Metabolic control of bacterial division. *Trends in Microbiology*. Vol. 24 Issue 3 Pages 181-189.
- Montville, T.J. y Matthews, K.R. (2008) *Food microbiology: An introduction*. 2nd ed, ASM Press, Washington D.C.

- Moujir, L., Gutierriz-Navarro, A. M., San-Andres, L. y Luis J. G. (1993). Structure–antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from salvia species. *Phytochem. Oxford* 34:1493–1495.
- Naidu, A. (2000). Overview. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 1–16). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Nandam, S.S., Surya, D.V. y Vangalapati, M. (2012). Purification of Cinnamaldehyde from Cinnamon Species by Column Chromatography. *International Research Journal of Biological Sciences*. Vol. 1(7), 49-51, November (2012).
- Nguyen, C. y Carlin, F. (1994) The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- O'Brien, A. y Holmes, R. (1987). Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Revs.* 51.
- Otoni, C., Avena, R., Azeredo, H., Lorevice, M., Moura, M., Matosso, L. y McHugh, T. (2017). Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables. *Comprehensive, Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.16, 1151-1169, 2017.
- Pavlath, A. E. y Orts, W. (2009). Edible films and coatings for food application. Chapter 1: Edible films and coatings: why, what, and how? Ed. springer. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Kerry_Huber/publication/253174398_Edible_Films_and_Coatings_for_Food_Applications/links/55eb577e08ae21d099c5e81f/Edible-Films-and-Coatings-for-Food-Applications.pdf
- Podschun R, Ullman U. (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Micro Rev.*

- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44. México. D.F.
- Roller, S. (2003). Chitosan: New food preservative or laboratory curiosity? In S. Roller (Ed.), *Natural Antimicrobials for the minimal processing of foods*. Boca Ratón, Florida: CRC press.
- Sabato, S., Ouattara, B., Yu, H., D'Aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M.A. y Lacroix, M. (2001). Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1397–1403.
- Saltveit, M., (1997) Physical and physiological changes in minimally processed fruits and vegetables. In: Tomas-Barberan FA, Robins RJ (Eds.) *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Clarendon Press, Oxford, New York.
- Sánchez, L.; Pastor, C.; Vargas, M., Chiralt A., González, Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 60(1):57-63. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.11.004
- Shiku, Y., Hamaguchi, P. y Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fish-eries Science* 2003; 69: 1026–32. DOI:10.1046/j.1444-2906.2003.00722.x
- Shin, S., Kim, S., Lee S., Park K., Han J. 2014. Apple peel and carboxymethylcellulose-based nanocomposite films containing different nanoclays. *J Food Sci* 79(3):E342–53.
- Shukla, R. y Cheryan, M. (2001) Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products* 13 : 171 – 192
- Simon SS, Sanjeev S (2007) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control* 18.

- Singh, A y Harsh, V. (2011). Challenge to healthcare: Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. 2011 International Conference on Food Engineering and Biotechnology. IPCBEE vol.9.
- Singh V. (2013). Salmonella Serovars and Their Host Specificity. Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry. Volume 1. Issue 3.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E. Nikolaou, C. Kokkini, S. Lanaras, T. y Arsenakis M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. J. Agric. Food Chem.
- Snyder, J.D., Wells, J.G., Yashuk, J., Puh, N. y Blake, P.A. (1984). Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. Am J Trop Med Hyg. 33.
- Soliva, R., Llunch, M. Quiles, A., Grigelmo, N. y Martín, O. (2003). Evaluation of textural properties and microstructure during storage of minimally processed apples. J Food Sci 67: 1958-1963.
- Stewart, C.M. (2003) *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal enterotoxins*. Ch 12 In: Hocking AD (ed) Foodborne microorganisms of public health significance. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney.
- Talan, D., Staatz, D., Staatz, A., Goldstein, E., Singer, K. y Overturf, G. (1989) *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: Laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. Journal of Clinical Microbiology 27(1):78–81
- Talarico, F., Roccia, E. y Nero, I. (1997) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus* in foodhandlers in the province of Catanzaro (Italy). Igiene Moderna 107.
- Thompson, D. P. (1990). Influence of pH on the fungitoxic activity of naturally occurring compounds. J. Food Prot. Vol. 53. Pages 428-429.

- Todar, K. (2007). Pathogenic E. coli. Online Textbook of Bacteriology. Department of Bacteriology: University of Wisconsin-Madison.
- Ultee, A. Gorris, L.G.M. y Amid E.J. (1998). Bacterial Activity of Carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Journal of Applied Microbiology.
- USDA. (1995). Agricultural Statistics 1995–96. United States Government Printing Office Washington.
- USDA. (2005). What we eat in America, Nhanes 2001-2002: Usual Nutrient Intakes From Food Compared To Dietary Reference Intakes. Agricultural Research Service. September 2005.
- Veres, K., Varga, E., Schelz, Z., Molnár, J., Bernáth, J. y Máthé, I. (2007). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of Four Lines of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. Ietswaart Grown in Hungary. Natural Product Communications.
- Wang, X., Sun, X., Liu, H., Li, M. y Ma, Z. (2011). Barrier and mechanical properties of carrot puree films. Food Bioprod Process 89(2):149–56.
- Wong, D. M. A.L. F., Hald, T., Wolf, P.J.v.d. y Swanenburg, M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. Livestock Production Science 76 No.3. 215–222, (September 2002).
- Yang, C.H., Yang, C.S., Hwang, M.L., Chang, C.C., Li, R.X. y Chuang, L.Y. (2012). Antimicrobial activity of various parts of *cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. Journal of Food Biochemistry, 36: 690–698. doi:10.1111/j.1745-4514.2011.00584.x
- Yeh, K.M., Chang, F.Y., Fung, C.P., Lin, J.C. y Siu, L.K. (2006) Mag A is not a specific gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is a part of the capsular polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* serotype K1. J Med Microbiol.

- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P. y Quek, S. (2015). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal Elsevier. Food Control* 59 (2016) 282e289.
- Zhong, Q. y Xia, W. (2007). Physiochemical properties of edible and preservative film chitosan/cassava starch/gelatine blend plasticized with glycerol. *Food Technol. Biotechnol.*, 46: 262-9.
- Zink, J., Wyrobnik, T., Prinz, T. y Schmid, M. (2016). Physical, Chemical and Biochemical Modifications of Protein-Based Films and Coatings: An Extensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 17, 1376.