



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Departamento Posgrado



**DESARROLLO DE MATERIALES
POLIMÉRICOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
MEDIANTE LA INCLUSIÓN DE
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR
BACTERIAS LÁCTICAS PARA EL CONTROL
DE CONTAMINANTES Y PATÓGENOS EN
ALIMENTOS**

Año 2013

Director

Dra. Graciela Margarita
Vignolo de Bartolucci

Director asociado

Dra. Patricia Eisenberg

Doctorando

Lic. en Qca. Mariana R.
Blanco Massani



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Departamento Posgrado



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Silvia Fernández de Brunetti

Dra. María Graciela Agüero

Lic. María Cristina Torres

Mag. Adriana Correa Zeballos

Master María Regina Rintoul

Dra. María Ángela Jure

Bioq. Farm. David José Merep

Sr. Mario Luis Rodríguez

Sr. Rodrigo Tomas Grau

Sr. Elías Maximiliano Gastal

Sra. Anabel Garay Maguna

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANA

Dra. Aida Ben Altabef

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Departamento Posgrado



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTORA:

Dra. Florencia Fagalde

REPRESENTANTE TITULAR EN EL DEPARTAMENTO DE POSGRADO DE LA UNT.:

Dra. Rosana Chehín

CONSEJO TITULAR:

Dra. Florencia Fagalde
Dra. María Inés Ybarra
Dra. Adriana María Sales
Dra. Nancy Roxana Vera
Dra. María Eugenia Bibas Bonet
Dra. Rosana Chehín
Farm. Mónica Eugenia Nacir

CONSEJO SUPLENTE:

Dra. Sonia Beatriz Díaz
Dra. María Cristina Rubio de Recupero



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Departamento Posgrado



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 615/07

Directora:

Dra. Mercedes Lizarralde de Grosso

Comité Académico:

Dra. Marta Inés Bühler
Dr. Atilio Pedro Castagnaro
Dr. Raúl Ricardo Raya
Dr. Alfredo Grau



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Departamento Posgrado



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**DESARROLLO DE MATERIALES POLIMÉRICOS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA MEDIANTE LA INCLUSIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS
POR BACTERIAS LÁCTICAS PARA EL CONTROL DE CONTAMINANTES Y
PATÓGENOS EN ALIMENTOS**

TESISTA:

Lic. en Qca. Mariana Raquel Blanco Massani

DIRECTORA:

Dra. Graciela M. Vignolo de Bartolucci

DIRECTORA ASOCIADA:

Dra. Patricia Eisenberg

COMISION DE SUPERVISION:

Dr. Raul R. Raya

Dra. Norma C. Samman

“Tal es el hombre; lleva los pies sobre la tierra y descansa sobre ella, pero vuelve la mirada hacia las estrellas, y recibe de ellas un descanso, que la tierra ha negado: *pedes in terra ad sidera visus*”.

Juan B. Terán

“Cuando hay voluntad, hay camino”.

Anónimo

A mis abuelos

Ellos siempre fueron un ejemplo para mi vida y mi carrera. Me enseñaron a perseverar, a aprender de los errores y me acompañaron en esta empresa desde sus comienzos.

A mi tía nena

Colega, amiga y referente en lo científico y musical.

A mis padres

Sin ellos no sería la persona que soy, de ellos aprendí que quien quiere, puede.

A Ri

Por su presencia incondicional en todo momento, sus consejos, su paciencia y amor.

AGRADECIMIENTOS LABORALES

A mis Directoras de Tesis: Graciela Vignolo y Patricia Eisenberg.

A los integrantes del Instituto Nacional de Tecnología Industrial y el Centro de Referencia para Lactobacilos.

A todos los integrantes de INTI-Plásticos, por acompañarme, compartir conmigo sus conocimientos y colaborar con esta difícil tarea.

Al directorio de INTI-carnes y los laboratorios de microbiología, físico-química y planta piloto, por facilitarme sus instalaciones para llevar a cabo gran parte del presente trabajo de tesis doctoral.

A todos los integrantes de ese centro, por los años de convivencia y buena predisposición, en especial la dedicación de Eugenia, Sol, Claudia, Ana Ribetto, Cristian, Viviana Renaud, Mariana Sanchez, Estela, Silvia, Ernesto y Gabriela.

Al Dr. Raul Raya, por impartir su mirada perspicaz en cada paso de este trabajo.

A Marta Quinteros y Mirian Gonzalez del departamento de Posgrado de la UNT por la paciencia y calidez brindada en el seguimiento a distancia de esta Tesis.

A Pedro Morando, por la buena predisposición para brindar sus conocimientos y su calidez humana.

A Ariel Guerbi, Mabel Taljuk y Pedro Falcato por la minuciosa y desinteresada entrega al encauzamiento bibliográfico de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Cuando un experimento no sale o una idea se cae, ante momentos de flaqueo en los que la propia voluntad pareciera no alcanzar para continuar, existen personas cuya presencia se vuelve crucial para seguir adelante; a todos, mi más sincero agradecimiento:

Esther, Pepe y Zulema, su contribución a partir de sus experiencias de vida, su compañía y todo el cariño en mis años de estadía en Buenos Aires fueron fundamentales para terminar esta tesis.

Ri, gracias por estos años de compañía y sustento emocional, fundamentales para llevar a cabo esta empresa.

Diego, Ximena, Amelia, Yanina, Leo; su compañía siempre con una palabra, un gesto de solidaridad me alentó a seguir en cada momento.

A Lau, Marie, Mechi, Víctor, Bety, Arielo y Mabelum; su presencia y ayuda fueron fundamentales para cumplir con esta empresa.

Mi familia, gracias por llenarme de abrazos y fuerza ante cualquier síntoma de flaqueo.

Mis compañeros de UTTM y UTTP, gracias por los almuerzos, los mates, las charlas y gratos momentos compartidos que contribuyeron a la continuidad de esta tarea.

Vanesita, gracias por tu colaboración, tus ansias de aprendizaje y tus manos dispuestas a ayudar.

Adrián Botana, gracias por las horas materializadas tanto al inicio como al final de esta Tesis.

Patricia, gracias por permitir la continuidad de esta empresa.

PRÓLOGO

El objetivo del presente trabajo de investigación se originó a partir de la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías en materia de seguridad alimentaria.

Aunque la globalización y liberalización del comercio mundial ofrece muchos beneficios y oportunidades, también presenta grandes y nuevos riesgos. La distribución de materias primas y/o alimentos desde sus orígenes de producción, procesamiento y empaque a los centros de consumo, incrementa los riesgos de transmisión de infecciones alimentarias con la consiguiente exposición de los consumidores a nuevos peligros. En los últimos años, la preocupación mundial por la seguridad alimentaria se vio incrementada debido al dramático impacto sobre la salud pública y la productividad industrial. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), tales como salmonelosis, listeriosis, infecciones debidas a *Escherichia coli* enterohemorrágica e intoxicaciones alimentarias causadas por contaminantes químicos entre otras, impulsó a la industria de alimentos, a los consumidores y a los organismos de gobierno a cuestionar los métodos usados en el control de los alimentos y de materias primas alimentarias (www.paho.org/spanish/d/p65.pdf). Una estimación de los costos directos e indirectos ocasionados por la inseguridad alimentaria en Argentina arrojó gastos por 8.000 millones de dólares/año desde el año 1999 (De Nicola y Valdivia 2006). En Argentina, la vigilancia alimentaria está a cargo del Instituto Nacional de Alimentos (INAL) dependiente de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), mientras que los datos de ETAs disponibles son los informados en el Boletín Epidemiológico Anual. Según el registro del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) respecto de las enfermedades de notificación obligatoria, se observó una duplicación de la tasa de notificación en los últimos 10 años con la consiguiente consolidación de la vigilancia. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en América Latina, el 70% de los casos de diarrea se debe al consumo de alimentos contaminados, siendo las enfermedades diarreicas agudas uno de los problemas de salud

pública más serios en los países en desarrollo y una de las causas principales de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años (Dirección de Epidemiología Ministerio de Salud de la Nación, 2011). En Argentina se han detectado contaminaciones de alimentos con microorganismos patógenos como *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Trichinella spiralis* y *Staphylococcus aureus*, entre otros (Pellicer y col. 2002; Di Pietro y col. 2004; Marzocca y col. 2004; Rivas y col. 2006; Roldán y col. 2007; López y col. 2008). En particular, el consumo masivo en nuestro país de productos listos para consumir (del inglés *ready to eat*, RTE) de origen cárnico, y el hecho que se reconozca su deficiente calidad higiénico-sanitaria, confirma la existencia de un nicho ecológico de alto riesgo para la población. Estos hechos ponen en evidencia la necesidad de implementar estrategias que aseguren la calidad higiénica de las materias primas y/o de los alimentos. Entre ellas, el desarrollo de materiales de empaque con actividad biológica para el control de contaminantes y patógenos, en particular para productos RTE, se ha visto incrementado por su significativo potencial en la seguridad y extensión de la vida útil de estos alimentos.

En esta Tesis se propone el desarrollo de materiales poliméricos con actividad antimicrobiana mediante la inclusión de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas para el control de contaminantes y patógenos en alimentos. Esta Tesis se encuentra estructurada en 7 Capítulos: (I) Introducción, (II) Materiales y métodos, (III) Obtención de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 para su incorporación en materiales poliméricos, (IV) Obtención de materiales poliméricos activos antimicrobianos, (V) Adsorción de las bacteriocinas producidas *L. curvatus* CRL705 en una película multicapa (T60XXB), (VI) Caracterización de los materiales activos, (VII) Determinación de la eficiencia de los materiales obtenidos en salchichas tipo Viena (modelo de alimento cárnico RTE) a escala piloto, y Conclusiones.

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Acrónimo	Significado
aa	amino ácidos
AIM	Actividad inhibitoria mínima
APET	Polietilen-tereftalato amorfo
BC	Bacteriocinas concentradas
BL	Bacterias lácticas
BPM	Buenas prácticas de manufactura
C-AL705	lactocina AL705 concentrada
CIM	Concentración inhibitoria mínima
C-Sac 7	Concentrado de metabolitos de Sac7
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
EVA	Etilen vinil acetato
EVOH	Etilen vinil alcohol
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generalmente aceptada como segura
H	Hora
HPMC	Hidroxipropil metil celulosa
HR	Humedad relativa
MAP	Atmósfera modificada
ODE	Organismos de deterioro específicos
OPA	Poliamida orientada
PA	Poliamida
P-AL705	lactocina AL705 purificada
PC	Policarbonato

PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de alta densidad
PEBD	Polietileno de baja densidad
PEBDL	Polietileno de baja densidad lineal
PET	Polietilen-tereftalato
pI	Punto isoeléctrico
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
PVdC	Policloruro de vinilideno
RTE	Del inglés <i>ready to eat</i> , productos listos para consumir
S-705	lactocina 705 sintética
SABC	Solución acuosa de bacteriocinas concentradas
SAMC	Solución acuosa de metabolitos concentrados
SIBPP	Solución isopropanólica de bacteriocinas parcialmente purificadas
SIMPP	Solución isopropanólica de metabolitos parcialmente purificados
SSPE	Solución obtenida por extracción en fase sólida
T60XXB	Fondo termoformable para envasar salchichas provista por Cryovac (Sealed Air, Argentina)
T73XXB	Tapa para envasar salchichas provista por Cryovac (Sealed Air, Argentina)
TMA	Tiempo mínimo de activación
UA	Unidades arbitrarias
WHO	World Health Organization

Contenido

RESUMEN	1
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
I.1 Ecosistemas cárnicos	4
I.2 Salchichas tipo Viena.....	5
I.3 Microbiología de productos cárnicos.....	6
I.4 Enfermedades transmitidas por alimentos	9
I.5 Manejo y conservación de alimentos cárnicos RTE.....	11
I.5.a Envases para productos cárnicos.....	12
I.6 Materiales activos	15
I.6.a Materiales activos antimicrobianos.....	17
I.6.b Obtención de materiales antimicrobianos.....	19
I.7 Biomateriales. Aprovechamiento de recursos renovables.....	20
I.8 Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BL). Clasificación.....	22
I.8.a Bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus curvatus</i> CRL705.....	27
I.8.b Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>L. curvatus</i> CRL705.....	28
I.8.c Cuantificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por <i>L. curvatus</i> CRL705	29
I.9 Nociones de Adsorción.....	30
I.9.a El modelo de Langmuir.....	31
I.9.b Comparación de datos con modelos de adsorción.....	33
I.9.c Adsorción de proteínas y péptidos en superficies.....	34
I.10 Materiales activos y su desempeño.....	35
I.11 Seguridad y aspectos legales de los envases.....	36
Antecedentes	38
Objetivo General.....	39
CAPITULO II.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
II.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	41
II.2 Obtención de las bacteriocinas producidas por <i>L. curvatus</i> CRL705	41
II.2.a Precipitación con sulfato de amonio y posterior liofilización	41
II.2.b Extracción en fase sólida usando isopropanol como eluyente	42
II.2.c Extracción con isopropanol	42
II.2.d Control biológico sin bacteriocinas.....	43
II.2.e Lactocina 705 sintética	43
II.3 Cuantificación de la actividad antimicrobiana en solución. Determinación del tiempo de difusión a 4°C.....	43
II.4 Cuantificación de las bacteriocinas en solución.....	44
II.5 Materiales poliméricos	46
II.5.a Películas comerciales.....	46
II.5.b Película obtenida a partir de un recurso renovable de origen agroindustrial	47
II.6 Soluciones utilizadas para la activación de las películas.....	48
II.7 Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas activas	48
II.8 Activación de las películas poliméricas	48
II.8.a Película multicapa.....	48
II.8.a.1 Selección del método de activación.....	48
I.8.b.1 Selección de la solución de activación. Diseño factorial*	49

II.8.c.1 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa.....	49
II.8.a.2 Selección de la solución de activación. Diseño factorial.....	50
II.8.a.3 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa.....	51
II.8.a.4 Influencia de la temperatura en la obtención de la película activa.....	52
II.8.a.5 Estabilidad y rendimiento de la solución de activación.....	52
II.8.a.6 Obtención de la película T60XXB activada con nisina.....	52
II.8.b Activación de la película obtenida a partir de un recurso renovable. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de lactocina 705 y lactocina AL705	53
II.8.c Estudio de adsorción de lactocina 705 en la película multicapa y su interacción con AL705 y las impurezas producidas por <i>L. curvatus</i> CRL705.....	53
II.8.c.1 Adsorbente y adsorbatos.....	53
II.8.c.2 Caracterización de los adsorbatos por espectroscopía infrarroja.....	53
II.8.c.3 Adsorción de lactocina 705 a partir de la bacteriocina sintética (S-705). Determinación de la CIM, cinética y equilibrio de adsorción de lactocina 705	54
II.8.c.4 Adsorción de las bacteriocinas en diferentes condiciones.....	55
II.9 Caracterización de las películas.....	56
II.9.a Película multicapa.....	56
II.9.a.1 Propiedades mecánicas	56
II.9.a.2 Permeabilidad al vapor de agua.....	57
II.9.a.3 Determinación del ángulo de contacto y propiedades de sellado	57
II.9.a.4 Ensayo de migración total	58
II.9.a.5 Estabilidad antimicrobiana de la película activa	58
II.9.a.6 Evaluación de la actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película activa luego del contacto con agua y aceite de girasol.....	58
II.9.b Película de gluten	59
II.9.b.1 Acondicionamiento de las muestras	59
II.9.b.2 Propiedades mecánicas y porcentaje de humedad.....	59
II.9.b.3 Estudio de las propiedades de las películas de gluten en función del tiempo de almacenamiento.....	59
II.10 Determinación de la eficiencia antimicrobiana de los materiales activos en un modelo alimentario (salchichas de Viena) a escala piloto.	60
II.10.a Elaboración de salchichas tipo Viena	60
II.10.b Obtención envases activos.....	62
II.10.b.1 A partir de películas multicapa.....	62
II.10.b.2 A partir de la película de gluten	62
II.10.c Inoculación de las salchichas.....	62
II.10.d Análisis microbiológico y determinación de la actividad antimicrobiana residual.....	63
II.10.e Análisis visual y determinación del pH.....	63
II.11 Análisis estadístico	63
CAPÍTULO III.....	65
OBTENCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR <i>L. CURVATUS</i> CRL705 PARA SU INCORPORACIÓN EN MATERIALES POLIMÉRICOS	65
III.1 Introducción	66
III.2 Resultados y Discusión	69
III.2.a Purificación de las bacteriocinas producidas por <i>L. curvatus</i> CRL705	69
III.2.b Cuantificación de la actividad antimicrobiana. Determinación del tiempo de difusión a 4°C	71
III.3 Conclusiones	74

CAPÍTULO IV	75
OBTENCIÓN DE PELÍCULAS ACTIVADAS CON LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR <i>L. CURVATUS</i> CRL705	75
IV.1 Introducción	76
IV.2 Resultados y Discusión	78
IV.2.a. Película multicapa antimicrobiana	78
IV.2.a.1 Selección del método de activación	78
IV.2.a.2 Selección de la solución de activación. Diseño factorial	80
IV.2.a.3 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa	83
IV.2.a.4 Influencia de la temperatura en la obtención de las películas activas	86
IV.2.a.5 Estabilidad y rendimiento de la solución de activación	87
IV.2.a.6 Obtención de la película T60XXB activada con nisina	88
IV.2.b Película obtenida a partir de un recurso renovable de origen agroindustrial	90
IV.2.b.1 Selección del material agroindustrial para la obtención de la película activa	90
IV.2.b.2 Activación de la película de gluten. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de lactocina 705 y lactocina AL705	91
IV.3 Conclusiones	92
CAPITULO V.....	93
ADSORCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR <i>L. CURVATUS</i> CRL705 EN LA PELÍCULA MULTICAPA (T60XXB).....	93
V.1 Introducción	94
V.2 Resultados y Discusión	95
V.2.a Caracterización de los adsorbatos por IRTF	95
V.2.b Adsorción de lactocina 705 en la superficie de PEBDL de la película multicapa	99
V.2.b.1 Determinación de la CIM	99
V.2.b.2 Efecto de la temperatura en la adsorción de lactocina 705	100
V.2.b.3 Efecto del tiempo de contacto en la adsorción de lactocina 705	101
V.2.c Isotherma de adsorción de lactocina 705	102
V.2.d Adsorción de las bacteriocinas en diferentes condiciones	104
V.2.d.1 Influencia de las impurezas y lactocina AL705 en la adsorción de lactocina 705.	104
V.2.d.2 Influencia del contenido de impurezas y la presencia de lactocina 705 en la adsorción de lactocina AL705	108
V.2.e Racionalización de resultados	109
V.3 Conclusiones	111
CAPÍTULO VI	113
CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS OBTENIDAS.....	113
VI.1. Introducción	114
VI.2 Resultados y Discusión	117
VI.2.a Película multicapa antimicrobiana	117
VI.2.a.1 Migración total, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua	117
VI.2.a.2 Determinación del ángulo de contacto y propiedades de sellado	118
VI.2.a.3 Estabilidad antimicrobiana de la película activa	120
VI.2.a.4 Actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película activa luego del contacto con simulantes de alimentos	122
VI.2.b Película de gluten	124
VI.2.b.1 Estudio de las propiedades de la película activa de gluten en función del tiempo de almacenamiento	124
VI.3 Conclusiones	130

CAPITULO VII.....	131
DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MATERIALES OBTENIDOS EN UN MODELO ALIMENTARIO (SALCHICHAS) A ESCALA PILOTO	131
VII.1 Introducción.....	132
VII.2 Resultados y Discusión.....	136
VII.2.a Influencia de la luz UV en la actividad de la película multicapa	136
VII.2.b Análisis microbiológico y visual, determinación del pH de paquetes de salchichas inoculados con <i>Lactobacillus plantarum</i> CRL 691 y <i>Listeria innocua</i> 7	137
VII.2.c Determinación de la actividad residual de las bacteriocinas	143
VII. 3 Conclusiones.....	145
CONCLUSIONES FINALES	146
PROYECCIONES.....	148
BIBLIOGRAFÍA	150

RESUMEN

La globalización del mercado de alimentos crea un entorno propicio para la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). En la Argentina, en 2010 se informaron más de un millón de casos de ETAs producidos por diversos organismos patógenos (tradicionales y emergentes). Entre las estrategias diseñadas para la extensión de la vida útil y/o preservación de la calidad higiénico-sanitaria de alimentos, la introducción del concepto de envase activo contribuyó significativamente al mejoramiento de la calidad y aceptabilidad de los mismos. Un envase activo es aquel que desarrolla alguna función adicional a la de proporcionar una barrera inerte frente a las condiciones externas. Entre estas funciones podemos mencionar la regulación del contenido de gases, el control de la humedad, la acción de diversas enzimas y la liberación de sustancias antimicrobianas. El uso de materiales de empaque antimicrobianos asegura el contacto de bajos niveles del compuesto activo con el alimento, comparado con la adición directa del antimicrobiano al producto. Por otra parte, la capacidad de las bacterias lácticas (BL) para producir péptidos antimicrobianos, así como su aplicación en alimentos, salud humana y animal está ampliamente difundida en la bibliografía. En particular, *Lactobacillus curvatus* CRL705 aislado de salames Argentinos artesanales demostró capacidad para producir varias bacteriocinas, entre las cuales lactocina 705 y lactocina AL705 han sido caracterizadas bioquímica y genéticamente, demostrando habilidad para inhibir patógenos y contaminantes en sistemas y productos cárnicos. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue obtener y caracterizar materiales activos antimicrobianos conteniendo bacteriocinas producidas por BL para el control de patógenos y contaminantes en productos cárnicos RTE. Los resultados obtenidos demostraron que las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 retienen su actividad antimicrobiana cuando se encuentran en la superficie de una película multi-capa de cara interna de polietileno de baja densidad lineal, así como incluidas en una película de gluten. La película activa multi-capa fue obtenida luego del

contacto (1 h, 30°C) con una solución acuosa de bacteriocinas concentradas (SABC, 267 UA/ml lactocina 705 y 2133 UA/ml AL705), obtenida a partir de *L. curvatus* CRL705. La película multi-capa activada con lactocina 705 y AL705 demostró mayor capacidad inhibitoria anti-*Listeria* que la misma película conteniendo nisina (bacteriocina aprobada como aditivo alimentario). Asimismo, la activación de una película de gluten por inclusión de la SABC en su formulación, demostró elevada capacidad anti-*Listeria*. Tanto la película multi-capa como la de gluten, mantuvieron sus propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua luego de la activación. Cuando las dos películas activas obtenidas fueron ensayadas como materiales de empaque (película multi-capa) y en forma de almohadilla (película de gluten), en el envasado de salchichas tipo Viena inoculadas con *L. innocua* 7, se observó actividad inhibitoria de lactocina AL705, mientras que la actividad de lactocina 705 (detectada usando *L. plantarum* CRL691 como cepa sensible) se vio disminuida por el alto porcentaje de grasa en la composición del alimento. La contribución de los materiales activos conteniendo bacteriocinas producidas por BL, tendría un elevado impacto sobre la seguridad alimentaria, disminuyendo pérdidas económicas por el deterioro de alimentos.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1 Ecosistemas cárnicos

Las diversas condiciones fisicoquímicas y tecnologías aplicadas a la carne durante su procesamiento permiten diferenciar fundamentalmente tres tipos de ecosistemas: carne cruda/fresca, productos fermentados y aquellos tratados térmicamente. El músculo esquelético de diferentes especies animales constituye un recurso de estratégica importancia económica y la obtención de diferentes cortes de carne a partir de las carcasas, compone el primer ecosistema en la cadena de procesamiento. Por otro lado, el almacenamiento a bajas temperaturas, así como la presencia de O₂ y CO₂ formando mezclas en concentraciones variables han demostrado ser efectivas en la extensión de la vida útil de alimentos perecederos, previniendo el desarrollo de microorganismos patógenos y contaminantes causantes de deterioro (Belcher, 2006; McMillin, 2008). La presencia de fracciones sustanciales de CO₂ en los envases permite retardar el crecimiento de microorganismos aeróbicos, mientras que una cierta concentración de O₂ es empleada para la preservación del color rojo de la carne. Por esta razón, los sistemas de distribución y comercialización de carne se basan principalmente en la refrigeración y envasado bajo vacío o atmósferas modificadas usando películas de diferentes permeabilidades. Como consecuencia, se produce un efecto selectivo sobre la microbiota presente con un predominio de bacterias lácticas (BL), *Enterobacteriaceae* y *Brochothrix thermosphacta*, cuyo desarrollo dependerá de la mezcla y proporción de gases utilizada en el envasado de la carne fresca (Labadie, 1999; Ercolini y col., 2006a; Vignolo y col., 2010).

En el caso de los productos cárnicos fermentados, éstos surgieron de modo fortuito como consecuencia de la actividad metabólica de la microbiota naturalmente presente en las materias primas. Los embutidos fermentados se definen como productos elaborados con una mezcla de carne, grasa, sal, agentes de curado y especias, embutidos en tripas naturales o sintéticas, fermentados, madurados y secados. En su producción se utiliza carne proveniente de diferentes especies animales aplicando diversas tecnologías y formulaciones, dando cuenta de la existencia

de una gran variedad de productos (Soriano y col., 2006; Ockerman y Basu, 2010; Paulsen y col., 2011). Durante la fermentación, la presencia de ciertos determinantes ecológicos como a_w (0.85-0.92), cloruro de sodio, nitratos/nitritos, azúcar y temperaturas (12 a 30°C) permite el establecimiento de una microbiota específica, naturalmente presente en las materias primas o adicionada como cultivos starters, resultando las BL y los cocos Gram-positivos, coagulasa-negativa (*Micrococcus* y *Staphylococcus*) los responsables de la fermentación (Lizaso y col., 1999; Lücke, 2000; Comi y col., 2005; Cocolin y col., 2009; Vignolo y col., 2010).

Por otra parte, la aplicación de elevadas temperaturas con el objeto de inactivar del crecimiento microbiano en los alimentos fue usada como una efectiva herramienta de preservación desde Pasteur en el siglo XIX. Los productos cárnicos procesados (curados o no) sometidos a diferentes tratamientos térmicos, comercializados frecuentemente refrigerados y envasados bajo vacío o en atmosferas modificadas, constituyen otro importante ecosistema. Estos alimentos cárnicos cocidos componen una serie de productos RTE de consumo masivo y gran relevancia económica, entre los cuales los jamones cocidos, embutidos emulsionados, productos de cerdo, pollo y pavo curados y/o ahumados, panceta y paté son los más representativos.

I.2 Salchichas tipo Viena

Con el nombre de Salchicha tipo Viena o Frankfurt, se entiende al embutido cocido, elaborado sobre la base de carne de cerdo o cerdo y vacuno, con el agregado de tocino, sal y especias, escaldado y luego ahumado hasta obtención de color moreno claro superficial (Capítulo VI, Código Alimentario Argentino). Según la Cámara Argentina de la Industria del Chacinado y Afines (CAICHA) (<http://www.caicha.org.ar/documentos/datosdelsector.htm>), en Argentina se elabora una amplia gama de productos chacinados compuesta por salchichas tipo Viena (16%), embutidos cocidos (17%), embutidos frescos (15%), hamburguesas (11%) y embutidos secos (12%), entre otros. Según estadísticas obtenidas por CAICHA en el año 2005, en Argentina el consumo de chacinados y afines fue de 8 Kg/año per cápita, de los cuales el 16% corresponde al

consumo de salchichas tipo Viena (www.caicha.org.ar/documentos/caracterizacion.ppt). Este tipo de salchichas constituye un producto de consumo masivo, con una gran proporción de niños entre los consumidores habituales.

La elaboración de la salchicha tipo Viena comprende diferentes etapas, desde el picado de sus ingredientes hasta el embutido en una tripa natural o sintética. En su formulación, se utilizan carne vacuna de color rojo intenso y de cerdo de color rosa claro, confiriendo esta mezcla consistencia a la masa. Para la formación de la emulsión cárnica, el picado de la carne y el mezclado con la grasa, ingredientes/aditivos y hielo se lleva a cabo en una sola operación, utilizando una máquina mezcladora (cutter). Esta masa cárnica emulsionada es luego embutida en tripas sintéticas, atadas en cadena, en piezas de aproximadamente 10 cm de largo y sometidas a un tratamiento térmico en tres fases (calentamiento a 50°C, 10-20 min; pasteurización 75-82°C, 10 min y, opcionalmente ahumado a 60-80°C, 10-30 min), dando como resultado la coagulación de las proteínas que conduce a una estructura firme y elástica. Finalmente, se produce el enfriamiento mediante una lluvia de agua fría o hielo antes de su almacenamiento a 5°C. En la mayoría de los casos las tripas sintéticas actúan solamente como molde de cocción, por lo cual las salchichas obtenidas son peladas antes de su envasado final.

I.3 Microbiología de productos cárnicos

La carne y productos cárnicos constituyen, desde el punto de vista microbiológico, un excelente soporte para el crecimiento bacteriano siendo su elevado contenido de agua (a_w cercana a 0.99) una característica que permite el crecimiento de gran cantidad de microorganismos. Las estrategias ecológicas adoptadas por éstos para crecer en los diferentes ecosistemas cárnicos, son consecuencia de las condiciones ambientales prevalecientes. A su vez, los factores intrínsecos y extrínsecos que gobiernan el desarrollo microbiano determinarán el tipo y número de bacterias presentes. Estos factores son predominantemente químicos (concentración y disponibilidad de nutrientes, pH, potencial redox, capacidad buffer, a_w , estructura de la carne) y fisicoquímicos

relacionados a las condiciones de proceso y almacenamiento (temperatura y composición de la atmósfera). Si bien en los productos cárnicos, la temperatura, pH, a_w , disponibilidad de nutrientes y oxígeno son a menudo manipuladas para extender la vida útil de la carne, estos parámetros fisicoquímicos no explican por qué la carne y los productos cárnicos seleccionan específicamente microorganismos no encontrados en otros alimentos (Labadie, 1999).

Estudios sobre la microbiología de la carne y productos cárnicos demostraron que aunque los mismos géneros bacterianos han sido reportados entre la fracción dominante, los resultados a nivel de especie fueron diferentes (Nychas y col., 2007). El predominio de especies bacterianas dentro de un mismo género determinará el rango de diversidad microbiana encontrada bajo las diferentes condiciones de proceso y almacenamiento. En los ecosistemas cárnicos, los metabolitos derivados de la vía glicolítica, (compuestos oxidativos, fuentes de energía hidrocarbonadas y aminoácidos) pueden ser catabolizados por las bacterias asociadas a la carne. Asimismo, la contribución de las enzimas endógenas de la carne durante su acondicionamiento puede considerarse despreciable comparada con la acción de las bacterias asociadas a la carne (Nychas y col., 2008).

Los microorganismos presentes en la carne fresca surgen de la contaminación del tracto gastrointestinal así como del ambiente con el cual el animal tuvo contacto antes y/o durante la faena (Koutsoumanis y Sofos, 2004). La carne es un agente selectivo para organismos aeróbicos, y un grupo de bacterias comúnmente dominadas por *Pseudomonas* spp. es el responsable de la contaminación aeróbica a temperaturas entre -1 y 25°C (Nychas y col., 2008). Organismos tolerantes al frío del género *Enterobacteriaceae* así como *Brochothrix thermosphacta* y BL están presentes en carne almacenada en condiciones aeróbicas. En condiciones de restricción de O₂, el desarrollo de pseudomonas está seriamente comprometido, favoreciendo el predominio de un consorcio microbiano principalmente compuesto por BL, *B. thermosphacta* y enterobacterias (Ercolini y col., 2006a; Fontana y col., 2006; Vignolo y col., 2010).

En el caso de productos cárnicos cocidos, el calentamiento hasta temperaturas de pasteurización destruye la mayoría de las células vegetativas (Borch y col., 1996; Korkeala y Björkroth, 1997), en consecuencia la composición de la microbiota en estos productos deriva de la manipulación posterior al tratamiento térmico, así como de las contaminaciones cruzadas. Así por ejemplo, estudios recientes sugieren que los microorganismos asociados con la contaminación en los productos cocidos envasados en atmósferas modificadas son introducidos por el contacto de la carne cruda (materia prima) durante su manipulación sobre las superficies de la línea de procesamiento, contribuyendo a la instalación de la denominada "house microbiota" en el embutido cocido (Vasilopoulos y col., 2010). Asimismo, la composición del producto, cadena de frío y las malas prácticas domésticas serán determinantes en la composición microbiana de este ecosistema cárnico (Samelis y col., 2000, Metaxopoulos y col., 2003, Marklinder y col., 2004). A su vez, las condiciones de refrigeración y envasado anaeróbico provocan la selección de la microbiota con predominio de BL y *B. thermosphacta* (Cayré y col., 2005), y aunque inicialmente los recuentos sean bajos, su desarrollo está ligado a la producción de ácidos, sabores y olores desagradables y compuestos deteriorantes del color que a menudo conducen al rechazo del producto desde el punto de vista sensorial (Gram y col., 2002; Doyle, 2007; Leroy y col., 2009). En la Tabla 1 se consignan los diferentes tipos de defectos causadas por la presencia de BL en salchichas.

Tabla 1. Tipos de defectos en salchichas envasadas al vacío (extraído de Korkeala y Björkroth, 1997)

Tipo de defecto	Detección	Causa
Acidez	Análisis sensorial (acidez)	Bacterias lácticas
Líquido blanco	pH Inspección visual (aparición)	Bacterias lácticas
Formación de gas	Inspección visual (disminución del vacío de los paquetes)	<i>Lactobacillus</i> heterofermentativos, <i>Leuconostoc</i>
Presencia de limo	Inspección visual (aparición de limo)	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i>

En estos productos cárnicos también pueden encontrarse microorganismos patógenos ubicuos como *L. monocytogenes*, quien es capaz de crecer en condiciones de refrigeración y restricción de O₂, y cuya presencia está generalmente asociada al manejo post-proceso y a las malas prácticas higiénicas con las que se realiza dicha operación. Basándose en factores de calidad y seguridad, la temperatura y su variación durante el tiempo de almacenamiento son parámetros de gran influencia en la vida útil de productos cárnicos cocidos (Mataragas y Drossinos, 2007).

I.4 Enfermedades transmitidas por alimentos

Aun cuando la carne y productos cárnicos hayan sido procesados y envasados con normas de higiene adecuadas y aplicando buenas prácticas de manufactura, su vida útil dependerá de las condiciones de almacenamiento y distribución. Además de los microorganismos de deterioro como *Pseudomonas*, *B. thermosphacta* y BL, capaces de crecer en condiciones de refrigeración y envasado bajo vacío o atmósferas modificadas, la presencia de organismos patógenos causantes de infecciones y toxi-infecciones alimentarias conocidas como enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), adquiere gran relevancia. La mayor amenaza para la seguridad alimentaria son los denominados patógenos emergentes, entre los cuales *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio parahemolyticus* han sido relacionados con el aumento de brotes de ETAs comparado con los patógenos tradicionales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Clostridium perfringes* (Elmi, 2004; Church, 2004). A pesar de las reglamentaciones y controles para garantizar la seguridad higiénica y calidad de los alimentos a lo largo de la cadena de producción, los brotes de ETAs resultan aun significativamente elevados. Según estudios publicados en 2011 por el Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC) de USA (<http://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/>), alrededor de 48 millones de personas contrajeron enfermedades, 3000 de las cuales murieron a causa de ETAs, siendo el 90% de ellas causadas por *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *C. perfringes*, *L.*

monocytogenes, norovirus y toxoplasma, involucrando productos cárnicos procesados como causantes. En Argentina, los datos de brotes son contradictorios; según un informe divulgado en el año 2011 por el Departamento de Epidemiología Alimentaria de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, durante el año 2010 se registró una disminución (56%) de los casos de ETAs en todo el país respecto al año 2009 (<http://www.agcontrol.gob.ar/pdf/Que-son-las-ETA.pdf>), sin embargo no se encuentra especificada la causa de las toxo-infecciones alimentarias reportadas. Por otro lado, según lo publicado en el Boletín Epidemiológico Anual 2010 (www.msal.gov.ar) se registró un aumento de “eventos gastroentéricos” respecto al 2009, incluyendo estas infecciones botulismo, botulismo del lactante, brucelosis, cólera, diarreas agudas sanguinolentas, diarreas sin especificar, fiebre tifoidea y paratifoidea, intoxicación por moluscos; síndrome urémico hemolítico (SUH), toxo-infecciones alimentarias y triquinosis.

La listeriosis, enfermedad transmitida por *L. monocytogenes*, es especialmente fatal en poblaciones humanas de alto riesgo como niños recién nacidos, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunológicamente deprimidas, presentándose los síntomas pocos días luego de la ingestión o hasta 6 semanas después. En Argentina, *L. monocytogenes* fue encontrada en muestras de diferentes productos cárnicos RTE e informada como la causa de numerosos brotes (Pellicer y col. 2002; Marzocca y col. 2004). Debido a la estrecha relación entre *L. monocytogenes* y las enfermedades transmitidas por determinados alimentos como productos cárnicos y de aves, así como el reconocimiento del alto riesgo para la salud pública, desde el año 1989 en USA, la FDA (Food and Drug Administration) y FSIS (Food Safety and Inspection Service) han promulgado y mantenido una política de tolerancia cero respecto a la presencia de este patógeno en alimentos RTE. Los esfuerzos de la industria para erradicar este patógeno produjeron una reducción de su prevalencia, no obstante debido a la imposibilidad de su eliminación total del ambiente y de los alimentos, se establecieron estrategias de manejo enfocadas en la cantidad de *L. monocytogenes* más que en su presencia (Chen y col., 2003). Por otra parte, de acuerdo al criterio microbiológico

fijado por la Unión Europea, los alimentos que contengan menos de 100 UFC por gramo de producto se consideran aceptables para el consumo humano (EC No 2073/2005).

Estudios realizados en Estados Unidos acerca de la incidencia de infecciones con patógenos transmitidos por alimentos mostraron que desde el período 1996-1998 hasta el año 2008 se produjo un descenso en aquellas infecciones causadas por *Listeria*, *Campylobacter*, *E. coli* O157 productora de toxina Shiga, registrándose un aumento en la incidencia de *Vibrio*; mientras que, la incidencia de infecciones causadas por *Cryptosporidium* y *Salmonella*, no experimentó cambios significativos en este período (CDC, 2009). En coincidencia, datos de este organismo (CDC) entre 2006 y 2012 indican una significativa disminución de los brotes de listeriosis respecto a la incidencia de otros patógenos (<http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html>). No obstante, informes de la Unión Europea correspondiente al año 2009, indicaron un aumento del 19% en los casos de listeriosis confirmados respecto al año 2008, siendo los productos de la pesca, quesos y productos cárnicos RTE los que presentaron la presencia de *L. monocytogenes* por encima de los límites permitidos (Lahuerta y col., 2011).

I.5 Manejo y conservación de alimentos cárnicos RTE

Por definición los alimentos cárnicos RTE o “comercialmente estériles”, son aquellos que pueden ser consumidos sin procedimientos adicionales que aseguren su calidad higiénica, y/o sin sufrir posteriores modificaciones a efectos de mejorar su gusto o apariencia. Durante el procesamiento, los productos cárnicos RTE son tratados térmicamente asegurando la destrucción de bacterias patógenas y contaminantes. No obstante, estos productos están a menudo implicados en casos de ETAs ya que en general no son sometidos a cocción adicional antes de su consumo. La ocurrencia de contaminaciones post-proceso antes del envasado, representa una posibilidad para la proliferación de bacterias dentro del envase, particularmente cuando el producto es sometido a abuso de temperatura.

La contaminación post-proceso en alimentos puede ocurrir por la aparición de agentes contaminantes en el material de empaque, superficies/utensilios en contacto con alimentos, fallas para separar áreas de pre- y post-procesamiento, abuso tiempo/temperatura en la etapa de cocción/enfriamiento y pobre higiene de los procesadores. Por todo ello, la responsabilidad para asegurar la calidad final de productos RTE recae sobre los procesadores de alimentos, ya que la etapa de distribución presenta numerosas variantes que complican aun más el aseguramiento de la calidad higiénica para el consumidor. Las diferentes rutas que los productos RTE pueden seguir antes de llegar a los consumidores incluyen su acopio en almacenes, distribución en camiones refrigerados desde procesadores a intermediarios y bocas de expendio, re-procesamiento, re-ensado y/o almacenamiento por fraccionadores (subdivisión en envases individuales) y distribución, almacenamiento y preparación por el consumidor.

A los efectos de prevenir post-contaminaciones con *L. monocytogenes*, se han desarrollado diversas estrategias de control. Además de las buenas prácticas de manufactura (BPM), se han implementado programas de control, especificando las condiciones de sanitización y operación, para ser aplicados en los ambientes de producción, así como en los vehículos transportadores de alimentos RTE. Asimismo, su apropiado manejo por fraccionadores y distribuidores, así como por los consumidores, ha sido reforzado mediante diversas especificaciones y programas de entrenamiento y educación (Klontz y col., 2008).

I.5.a Envases para productos cárnicos

Los envases utilizados para el almacenamiento y distribución de productos cárnicos deben tener ciertas características para proteger el alimento de las condiciones externas y mantener su calidad. La barrera al vapor de agua constituye una propiedad fundamental para evitar pérdidas de peso por evaporación. A su vez, estos envases persiguen como objetivo evitar la contaminación, retardar el deterioro, permitir la actividad enzimática para mejorar la ternura y asegurar la presencia de oximioglobina de carnes rojas (Brody, 1997), mientras que en productos cárnicos

procesados evitan la decoloración, oxidación de lípidos y pérdida de aroma (Mondry, 1996). Asimismo, como se describió anteriormente, los sistemas de distribución y comercialización de carne y productos cárnicos se basan principalmente en la refrigeración y envasado bajo vacío o atmósferas modificadas. En consecuencia, el material polimérico empleado en envases destinados para alimentos cárnicos debe presentar baja permeabilidad al vapor de agua y a gases como el O₂ o CO₂. Otro requerimiento fundamental del envase es poseer una resistencia mecánica tal que permita contener el alimento, evitar pérdidas por goteo y soportar presión gaseosa (en el caso de almacenamiento del producto en atmósfera modificada). Si las propiedades requeridas para envasar un alimento no pueden satisfacerse con un solo material polimérico, se puede usar la combinación de varios polímeros con propiedades individuales diferentes (Tabla 2).

Tabla 2. Materiales poliméricos y propiedades asociadas (extraído de Walsh y Kerry, 2002)

Material polimérico	Propiedades asociadas
PEBD	Sellabilidad, capacidad de deformación plástica, barrera al vapor de agua, bajo costo
PEBDL	Sellabilidad, resistencia al abuso, capacidad de deformación plástica, barrera al vapor de agua
PP	Barrera al vapor de agua, resistencia térmica, estabilidad dimensional
EVOH	Sellabilidad, mayor resistencia al abuso que el PEBD, transparencia
PET	Resistencia mecánica, resistencia al calor, barrera media al O ₂
EVA	Alta barrera al O ₂ , buena co-extrusión, procesabilidad, transparencia
PA	Resistencia mecánica, barrera al O ₂ , (sensible a la humedad), capacidad de deformación plástica
PVdC	Alta barrera al O ₂ (resistente a la humedad), barrera a las grasas
PEAD	Mejores propiedades de barrera a los gases que el PEBD, bajo costo, resistente, transparencia reducida
PVC	Versátil, propiedades de contracción, transparente, bajo costo
PS	Excelente transparencia, bajo costo, fácilmente termoformable y moldeable por inyección
PC	Alta transparencia, resistencia al impacto, rigidez
Ionómero	Sellabilidad, produce películas resistentes y transparencia inusual

Para envasar carne y productos cárnicos se utilizan envases conocidos como materiales multicapa ya que están formados por varias capas de polímeros (Tabla 3). Cada capa puede combinarse por laminado de dos o más películas previamente extrudadas, que serán unidas utilizando adhesivos o por co-extrusión y adhesión de un polímero fundido entre las distintas capas (Walsh y Kerry, 2002).

Tabla 3. Composición de envases utilizados comúnmente para productos cárnicos (extraído de Mondry, 1996)

Tipo de Envase	Materiales del fondo	Materiales de la tapa (cuando corresponda)
Flexible de vacío	PA-PEBD, co-extrudado como una película de 5 capas	-
Flexible MAP	PA-PEBD	OPA-PEBD
	PA-EVOH-PEBD	-
	PA-EVOH-PA-PEBD	PET-PVdC-PEBD
	PP-EVOH-PEBD	-
	PEBD-EVOH-PEBD	-
Rígido de vacío	APET	OPA-PEBD
	PVC o PVC-PEBD	PET-PVdC-PEBD
	PS-EVOH-PEBD	OPA-PEBD-EVOH-PEBD
	-	PET-PEBD-EVOH-PEBD
Rígido MAP	PVC	OPA-PEBD
	PVC-PEBD o PVC-EVOH-PEBD	PET-PVdC-PEBD
	APET	OPA-PEBD-EVOH-PEBD
	APET-PEBD o APET-EVOH-PEBD	PET-PEBD-EVOH-PEBD
	PS-EVOH-PEBD	-
Bandejas	PVC-PEBD	Varias combinaciones de hasta siete o más capas incluyendo una de EVOH como barrera a los gases
	APET	
	APET-PEBD	

I.6 Materiales activos

En el pasado, las funciones de los envases estaban limitadas a los roles de contención del alimento, protección de su contenido de los efectos del ambiente, conveniencia y utilidad del producto alimenticio y comunicación de la información del mismo (Cho y col., 2009). Mientras las funciones convencionales del envase se consideraban pasivas, un nuevo paradigma de envase emergió como respuesta a las exigencias en el manejo de productos RTE y a las demandas de los consumidores. De esta manera se introdujo en el mercado de alimentos el concepto de envase activo, cuyo objetivo es extender la vida útil y asegurar la calidad higiénico-sanitaria del alimento que contiene. No obstante, esta novedosa herramienta no implica una sustitución de las BPM y los programas de control.

Un envase se considera activo cuando es capaz de desarrollar alguna otra función que la de proporcionar una barrera inerte frente a las condiciones externas. Entre estas funciones se destacan la regulación del contenido en gases (O_2 , CO_2 , etileno, etc.); control de humedad mediante el uso de aditivos absorbentes; acción de diversas enzimas (control de colesterol y lactosa), así como la liberación de sustancias antimicrobianas (etanol, fungicidas, bacteriocinas). En la Tabla 4 se muestran ejemplos de los diversos sistemas de empaque activos y su aplicación en alimentos.

Tabla 4. Ejemplos de sistemas de empaque activos (extraído de Day, 2008)

Sistema de empaque activo	Mecanismos	Aplicación en alimentos
Absorbedores de oxígeno	Hierro, Metal/ácido Nylon MXD6 Metal (por Ej. platino) catalizador Ascorbato/sales metálicas Enzimas	Pan, tortas, galletas de arroz, biscochos, pizza, pasta, queso, carnes curadas y pescado, café, snacks, comidas deshidratadas y bebidas
Absorbedores y emisores de CO ₂	Óxido de hierro/hidróxido de calcio Carbonato de hierro/haluros metálicos Óxido de hierro/carbón activado Ascorbato/ bicarbonato de sodio	Café, carnes y pescado fresco, nueces, snacks y tortas esponjosas
Absorbedores de etileno	Permanganato de potasio Carbón activado Arcillas activadas/zeolitas	Frutas, vegetales y otros productos de horticultura
Liberadores de preservantes	Ácidos orgánicos Zeolitas de plata Especies y extractos de hierbas antioxidantes butil hidroxianisol / butil hidroxitolueno Vitamina E Dióxido de cloro/dióxido de azufre Bacteriocinas	Cereales, carne, pescado, queso, snacks, frutas y vegetales
Emisores de etanol	Etanol encapsulado	Pizza, tortas, pan, biscochos, pescado y otros productos panificados
Absorbedores de humedad	Manta de polivinil alcohol Arcillas activadas y minerales Silica gel	Pescado, carne, pollo, snacks, cereales, alimentos secos, sándwiches, frutas y vegetales
Absorbedores de olores y sabores	Triacetato de celulosa Papel acetilado Ácido cítrico Sales de hierro/ascorbato Carbón activado/arcillas/zeolitas	Jugo de frutas, snacks fritos, pescado, cereales, pollo, productos lácteos y frutas
Envases con control de temperatura	Plásticos no reticulados Contenedores de doble pared Hidrofluorocarbono Óxido de calcio/agua Nitrato de amonio/agua Cloruro de calcio/agua Aleaciones súper-corrosivas/sal agua Permanganato de potasio/glicerina	Alimentos RTE, carne, pescado, pollo y bebidas
Películas compensadoras de temperatura	Polímeros de cadena lateral cristalizable	Frutas, vegetales y otros productos de horticultura

I.6.a Materiales activos antimicrobianos

Los materiales antimicrobianos constituyen una variante de los materiales activos que permiten controlar el crecimiento de microorganismos en la superficie de alimentos y eventualmente reducir el recuento microbiano de dichos productos (Cho y col., 2009), con la consiguiente extensión de la vida útil del alimento contenido en el envase. Entre los materiales poliméricos empleados en envases para carne y productos cárnicos, se encuentran películas de quitosano, celulosa, metil celulosa, hidroximetil celulosa, películas a base de proteínas de suero de leche, cereales y oleaginosas, así como las formadas por polímeros sintéticos como el polipropileno y polietileno de baja densidad, PVC, entre otros. Estas matrices pueden combinarse con antimicrobianos como ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico, sórbico), enzimas (glucosa oxidasa, lisozima) y bacteriocinas para formar materiales activos (Tabla 5).

La inclusión de bacteriocinas en materiales poliméricos despierta gran interés en la industria alimentaria debido al consumo cada vez mayor de productos RTE mínimamente procesados y libre de conservantes. En los últimos años, la atención se focalizó en la prevención del desarrollo de contaminantes en los alimentos mediante la aplicación de antimicrobianos en su superficie, más que en tratar de remover los microorganismos indeseables una vez que estos han contaminado el alimento (Guerra y col., 2005a). El uso de envases antimicrobianos asegura que solo bajos niveles del bio-preservante estarán en contacto con el alimento, comparado con la adición directa de los mismos en el producto. En la literatura existen evidencias del efecto de las sustancias antimicrobianas como aditivos indirectos en alimentos mediante su incorporación en materiales poliméricos, con el objeto de reducir la contaminación superficial de los mismos (Joerger, 2007; Vermeiren y col., 2002; Cooksey, 2005)

Tabla 5. Polímeros utilizados para extender la vida útil de carne y productos cárnicos (recopilación obtenida de Joerger, 2007)

Matriz polimérica	Sustancia antimicrobiana	Producto cárnico	Referencia
Zeína/PG, zeína/EtOH	Nisina, Nisina/ propionato de Calcio	Pollo	Janes y col. (2002)
PE	Nisina	Carne vacuna	Siragusa y col. (1999)
Plástico con MC/HPMC	Nisina	Salchichas	Franklin y col. (2004)
Insertos de papel	Nisina	Jamón cocido feteado	Scannell y col. (2000)
PE	Nisina/EDTA	Carne vacuna	Cutter y col. (2001)
PVC, Nylon, LLDPE	Nisina/EDTA/Ácido cítrico/Tween 80	Muslos de pollo	Natrajan y Sheldon (2000)
PE	Bacteriocina de <i>L. curvatus</i>	Salchichas	Ercolini y col. (2006b)
Celulosa	Pediocina	Jamón, carne vacuna, Mortadela	Ming y col. (1997)
Proteína de suero de leche	Ácido sórbico, Ácido sórbico/ácido p- amino benzoico		Cagri y col. (2002)
Quitosano	Ácido acético, cinamaldehído (1%), aceite esencial de orégano (2%)	Jamón cocido, mortadela, pastrami	Ouattara y col. (2000) Zivanovic y col. (2005)
Película multicapa de PE	Semilla de pomelo	Carne molida	Ha y col. (2001)
Proteínas de leche	Aceite esencial de orégano	Carne vacuna	Oussalah y col. (2004)
Caseinato	Polvo de especias (tomillo, romero, salvia)	Carne vacuna	Ouattara y col. (2002)
Proteína de suero	Sistema lactoperoxidasa	Salmón ahumado	Min y col. (2005)
Proteína de suero de leche	Sistema lactoperoxidasa	Pollo asado	Min y col. (2006)
Plástico	Triclosan	Carne vacuna	Cutter (1999)
LDPE	Triclosan	Pollo	Vermeiren y col. (2002)
LDPE	Hexametil tetramina	Jamón cocido	Devlieghere y col. (2000)

Entre las bacteriocinas usadas como antimicrobianos en alimentos, nisina producida por *Lactococcus lactis*, organismo GRAS (del inglés *Generally Regarded As Safe*) ha sido aprobada para este fin por la FDA y WHO. Esta bacteriocina es el péptido antimicrobiano mas utilizado en películas poliméricas, sola o en combinación con otros antimicrobianos (Joerger, 2007). Debido a que el blanco de acción de estos péptidos antimicrobianos son microorganismos Gram positivos, han sido aplicados en materiales sintéticos y naturales para reducir principalmente la

contaminación con *L. monocytogenes* en alimentos. Para productos cárnicos en particular, se han evaluado diferentes materiales utilizando como antimicrobiano nisina (Ming y col., 1997; Siragusa y col., 1999; Scannell y col., 2000; Franklin y col., 2004; Grower y col., 2004a, b; Guerra y col., 2005a), pediocina (Nielsen y col., 1990; Ming y col., 1997), así como la bacteriocina antilisteria producida por *Lactobacillus curvatus* 32Y (Mauriello y col., 2004; Ercolini y col. 2006).

I.6.b Obtención de materiales antimicrobianos

Cuando se considera el rol biológicamente activo de un agente antimicrobiano en una película polimérica, la relación entre la matriz polimérica y el agente antimicrobiano resulta crítica, ya que la degradación térmica del antimicrobiano durante la fabricación así como su compatibilidad química con el material de la película pueden limitar su actividad antimicrobiana (Cho y col., 2009). Se han estudiado diversos métodos para la obtención de películas con actividad antimicrobiana por activación superficial de polímeros, entre los cuales se ensayó la inmersión (soaking) del material polimérico dentro de una solución activa (Mauriello y col., 2004), contacto y adsorción (Guerra y col., 2005a), *casting* sobre el material polimérico (Grower y col., 2004a,b), *spray*, *spreading* y *spin-coating* (Mauriello y col., 2004; Han y col., 2007; Iseppi y col., 2008). Estos métodos de obtención de películas activas utilizan tratamientos térmicos suaves que no superan los 70°C.

También pueden obtenerse películas poliméricas que contengan el antimicrobiano en su matriz por extrusión del material junto al compuesto inhibitorio (Ha y col., 2001; Del Nobile y col., 2009). Sin embargo, la activación durante la extrusión de polímeros sintéticos (PVC, PEBD, PP, PET, etc.) y algunos biodegradables como PCL y PLA obliga a la elección de agentes antimicrobianos térmicamente estables, ya que las temperaturas de procesamiento van desde 80 a 260 °C, dependiendo del polímero. En el caso de agentes antimicrobianos inestables a altas temperaturas, éstos pueden ser adicionados en matrices biopoliméricas obtenidas por evaporación

de solvente (casting) (Buonocore y col., 2004; Conte y col., 2004). En consecuencia no se requieren altas temperaturas para fundir el polímero y formar una película.

Existen agentes antimicrobianos que ofrecen resistencia a las temperaturas, por ejemplo diversos compuestos inorgánicos (zeolitas, montmorillonitas, iones plata, dióxido de titanio), mientras que otros de origen biológico presentan menor resistencia a altas temperaturas de procesamiento (bacteriocinas, lisozima, extractos vegetales). La selección de un determinado antimicrobiano dependerá principalmente del microorganismo que se quiere combatir con el envase activo y una vez seleccionado el antimicrobiano, deberá tenerse en cuenta la compatibilidad con el material polimérico y encontrar un método de obtención de la película activa que se adapte a las características del antimicrobiano (estabilidad en las condiciones de procesamiento).

I.7 Biomateriales. Aprovechamiento de recursos renovables

Con la excepción del papel, los materiales de empaque para alimentos han sido producidos tradicionalmente a base de productos no renovables. No obstante hasta las primeras décadas del siglo XX, los materiales de empaque junto a otros muchos productos industriales (tintas, colorantes, pinturas, tejidos, etc.) fueron producidos a partir de recursos de origen biológico; más adelante en esta centuria los derivados del petróleo reemplazaron casi completamente a los materiales de origen biológico. En la actualidad, en los comienzos del siglo XXI y debido al elevado impacto ambiental producido por el descarte de productos derivados del petróleo, la sustentabilidad y reemplazo de recursos no renovables por aquellos provenientes de fuentes renovables ha llamado la atención de la sociedad. Se entiende como recurso renovable, principalmente a aquellos productos derivados de materiales vegetales y los subproductos de su fermentación (Robertson, 2006a). Según Irmak y Erbatur (2008), luego de su vida útil, los materiales utilizados en envases deben ser capaces de mineralizarse por biodegradación en un período de tiempo razonable para no causar problemas ambientales. Los materiales de empaque

basados en productos biológicos fueron definidos como productos derivados principalmente de fuentes renovables anualmente, con excepción de aquellos derivados del papel cuyo tiempo de renovación es mayor dependiendo de la especie vegetal (Haugaard y Mortensen, 2003).

Los biomateriales de empaque han sido divididos en tres tipos reflejando su desarrollo histórico. Los de primera y segunda generación incluyen polímeros sintéticos conteniendo 5-25 y 40-75% de almidón respectivamente, siendo este compuesto responsable del grado de biodegradación. Los materiales de tercera generación están compuestos exclusivamente por biomasa siendo por lo tanto biodegradables (Gontard y Guilbert, 1994). Este tipo de materiales puede ser clasificado en tres categorías de acuerdo a su método de obtención: (i) polímeros extraídos directamente de biomasa, (ii) polímeros producidos por síntesis química clásica a partir de monómeros de biomasa y (iii) polímeros producidos directamente por organismos naturales o modificados genéticamente (Robertson, 2006a). En la primera categoría, la mayoría de los polímeros son extraídos de productos marinos y agroindustriales como polisacáridos (celulosa, almidón y quitina) y proteínas (caseína, suero de leche, colágeno, soja, zeína, gluten, entre otros). Las proteínas son heteropolímeros formados por aminoácidos (aa) cuyos grupos moleculares pueden interactuar por medio de enlaces hidrógeno (aa polares no iónicos), interacciones iónicas (aa ionizados), interacciones no polares (aa no polares) o enlaces covalentes (aa que forman puentes disulfuro o di-tirosina). Esta estructura heterogénea provee varios sitios potenciales de reacción para el entrecruzamiento o injerto químico (Guilbert y Bernard, 2005). La formación de películas poliméricas requiere que las proteínas formen estructuras extendidas, para ello estos polipéptidos deben desnaturalizarse por calor, tratamiento con ácidos, bases y/o solventes. Una vez separadas, las cadenas proteicas pueden re-asociarse mediante enlaces hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas o enlaces covalentes (Bourtoom, 2008).

En particular, la proteína de trigo es una masa viscoelástica formada por una mezcla compleja de hasta 50 clases de polipéptidos divididos en gliadinas que se agregan mediante

interacciones no covalentes otorgando el componente viscoso al gluten y gluteninas que otorgan elasticidad debido a su entrecruzamiento mediante puentes disulfuro (Zhang y col., 2005; Zhang y Zeng, 2008; Athamneh y col., 2008). Muchos estudios se han enfocado en la producción de películas de gluten de trigo por casting o procesamiento térmico (Gennadios y col., 1993; Gontard y col., 1996; Tropini y col., 2004; Hochstetter y col., 2006; Song y col., 2008; Athamneh y col., 2008; Zhang y col., 2010). Estos biopolímeros se han utilizado ampliamente para extender la vida útil de alimentos (Cha y Chinnan, 2004; Cagri y col., 2004; Coma, 2008) y en los últimos años se ha puesto especial atención en la incorporación de bacteriocinas a estos materiales. Numerosos estudios dan cuenta de la obtención de biopelículas con actividad anti-*Listeria* mediante la inclusión de nisina y otras bacteriocinas como enterocina, pediocina y lacticina 3147 con el objeto de controlar la proliferación bacteriana en alimentos (Ming y col., 1997; Scannell y col., 2000; Luchansky y Call, 2004; Lungu y Johnson, 2005; Ibarguren y col., 2010a).

I.8 Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (BL). Clasificación

Actualmente, diversos agentes preservantes sintéticos son usados para controlar el número de microorganismos en alimentos envasados; sin embargo, la concientización del consumidor respecto a los riesgos potenciales asociados a agentes sintéticos, induce a la búsqueda de preservantes disponibles en la naturaleza. (Cho y col., 2009). Las bacteriocinas producidas por BL poseen un gran potencial tecnológico en la preservación biológica de alimentos debido al carácter GRAS de los microorganismos productores, considerando que los mismos han estado presentes en alimentos fermentados desde tiempos inmemoriales (Cotter y col., 2005). El continuo descubrimiento de bacteriocinas en los últimos años, incluyendo muchas producidas por bacterias Gram positivas, dio como resultado la caracterización de una enorme y heterogénea cantidad de compuestos. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos, modificados o no, producidos ribosomalmente por bacterias resultando inmunes a su acción (Rea y col., 2011). Generalmente estas sustancias inhibitorias son activas frente a microorganismos contaminantes y patógenos de

alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* (Cotter y col., 2005; Heng y col., 2007; De Vuyst y Leroy, 2007; Vignolo y col., 2012). En los últimos 25 años se han propuestos diferentes esquemas de clasificación de las bacteriocinas, que en la actualidad pueden resumirse en la existencia de tres clases (Tabla 6). Las bacteriocinas de clase I o lantibióticos se caracterizan por contener uno o más residuos de aminoácidos modificados (lantionina, β -meti lantionina), los cuales forman puentes covalentes entre aminoácidos. Esta familia se ha subdividido en subclases involucrando a los lantibióticos y lantipeptidos (lantibióticos que no poseen actividad antimicrobiana), labirintopeptidos, que son lantibióticos que contienen labionina (aminoácido carbacíclico) y los sanctibióticos que presentan uniones puente sulfuro-carbono α (Goto y col., 2010; Meindl y col., 2010; Rea y col., 2011). Existen varios mecanismos de acción de las bacteriocinas de la clase I frente los microorganismos sensibles, entre los cuales algunos lantibióticos (nisina, lacticina 3147) presentan un modo de acción dual (Fig. 1). Estos péptidos forman un complejo con el último precursor de la pared celular (lípidos II), inhibiendo en consecuencia su formación. Los complejos luego se agregan incorporando más péptidos y forman un poro en la membrana de la bacteria. También se ha estudiado que algunos lantipeptidos (mersacidina) pueden unirse al lípidos II pero no forman un poro posteriormente; mientras que a la inversa, otros lantibióticos (Pep5 y epilancina K7) forman poros pero sin utilizar el lípidos II como molécula de anclaje (Bierbaum y Sahl, 2009; Knerr y van der Donk, 2012).

Respecto a los sanctibióticos, estudios realizados en la bacteriocina subtilosina mostraron que esta presenta un modo de acción específico para las dos especies sensibles analizadas hasta el momento (van Kuijk y col., 2011).

Tabla 6. Esquema de clasificación de bacteriocinas producidas por microorganismos Gram positivos (extraído de Rea y col. 2011)

Clase	Descripción	Subdivisiones	Ejemplos
<i>Clase I</i>	<i>Péptidos modificados</i> (a) Lantibióticos y lantipeptidos	Subclases* I y II (modificadas por las proteínas LanBC y LanM). 12 subclases de acuerdo a la secuencia de aa.	I (LanBC) nisina A, Z, F, epidermina, gallidermina, streptina, pep5, epilancina K7
		Subclases III y IV (modificadas por las proteínas tipo RamC y LanL, respectivamente)	II (LanM) lacticina 3147, salivaracina B, mersacidina, cinnamycina III (RamC) ramS, amfS, sapT IV (LanL) venezuelina
		(b) Labyrinthopetinas	-
	(c) Sactibióticos	Dos subclases: bacteriocinas mono y di-peptídicas	mono-peptídica subtilosina A di-peptídica thuricina CD
<i>Clase II</i>	<i>Péptidos no modificados</i> (a) Bacteriocinas anti- <i>Listeria</i> tipo pediocina	Cuatro subgrupos: I–IV	Subgrupo I coagulina K, divergicina M35, divergicina V41, enterocina A, leucocina C, listericina 743 A, munticina CRL35, munticina KS, pediocina PA-1, pisciocina CS 526, piscicolina 126, sakacina P, sakacina 5X, Subgrupo II lactococcina MMFII, leucocina A, mesentericina Y105, plantaricina C19, plantaricina 423, sakacina G Subgrupo III curvacina A, carnobacteriocina BM1, enterocina P Subgrupo IV bacteriocina 31 A, bacteriocina

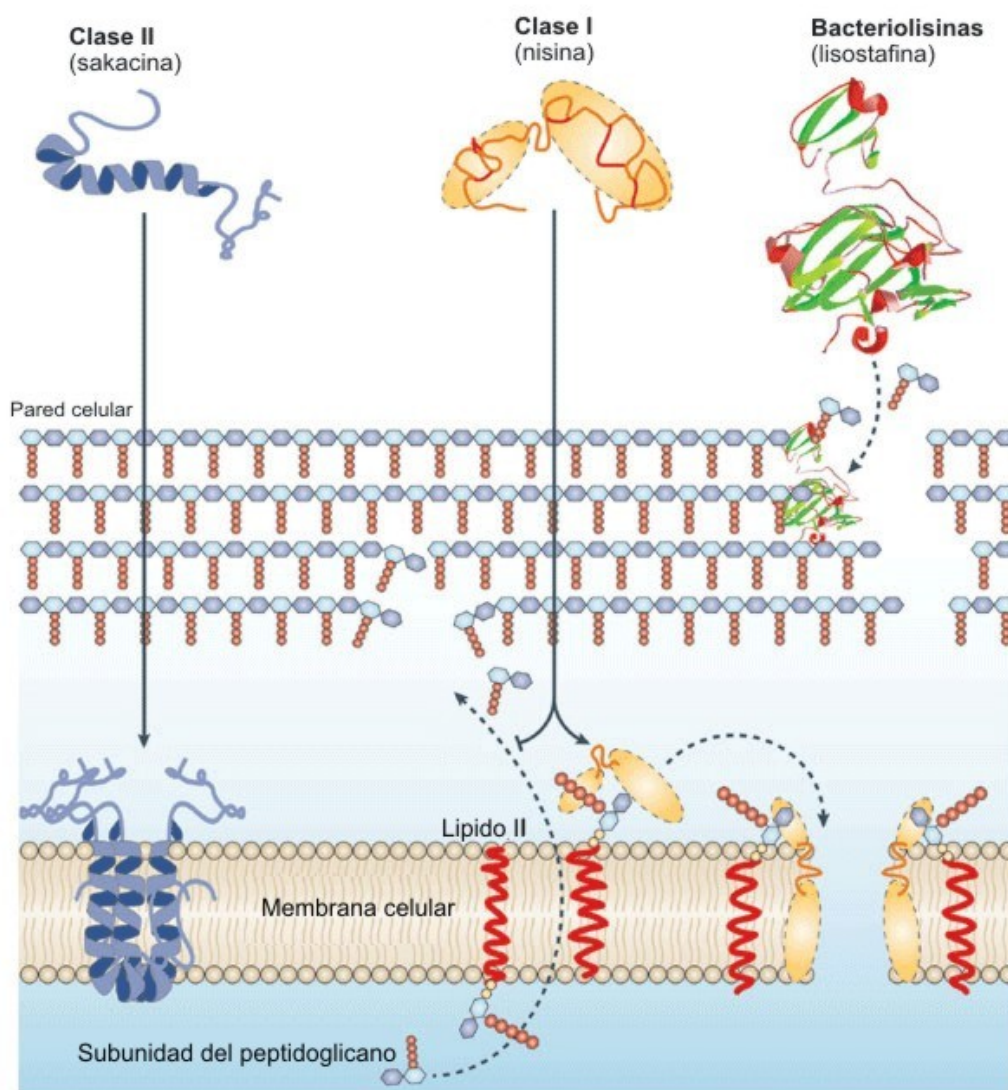
		RC714, bacteriocina T8, penocina A; enterocina SE-K4, carnobacteriocina B2
(b) Bacteriocinas bi-peptídicas	Subclases A y B	A lacticina F, lactocina 705, plantaricina E/F, plantaricina J/K, plantaricina NC8, plantaricina S, salivaricina B lactococcina G, lactococcina Q, enterocina 1071
(c) Bacteriocinas circulares extremos N- y C- terminal unidos covalentemente	Subclases I y II	Subclase I carnociclina A, lactociclicina Q, enterocina AS-48, circularina A, uberolisina Subclase II gassericina A, reutericina 6
(d) Bacteriocinas lineales monopéptidos que no entran en las tipo pediocina	-	lactococcina A, aureocina A53, lactococcina B
<i>Bacteriolisinas</i> <i>Proteínas líticas</i>	-	lisostafina, helveticina J, zoocina A, enterolisina A, millericina B

* Las subclases se definieron de acuerdo a las enzimas que modifican los pre-peptidos durante la maduración (Rea y col. 2011).

Para una descripción más detallada de la clasificación de bacteriocinas y su modo de acción consultar los artículos de Drider y col., 2006; Bierbaum y Sahl, 2009; Piper y col., 2009; do Carmo y col., 2010; Rea y col., 2011.

La clase II de bacteriocinas, compuesta por péptidos que carecen de residuos modificados, se subdivide en cuatro subclases (Tabla 6). La mayoría de las bacteriocinas de esta clase inducen permeabilización de la membrana y la posterior pérdida de moléculas del interior de la bacteria sensible (Fig. 1) (Cotter y col., 2005; Nissen-Meyer y col., 2009; Martin-Visscher y col., 2011). Particularmente, las bacteriocinas de la clase IIa se unen a la membrana a través de una molécula de anclaje formando poros que causan disipación de la fuerza protón motriz y disminución del ATP intracelular (Drider y col., 2006), mientras que en las bacteriocinas de la clase IIb (bacteriocinas de dos componentes), la actividad antimicrobiana se obtiene por complementación

de los péptidos que la componen, formando poros que permiten el pasaje selectivo de ciertas moléculas (Nissen-Meyer y col., 2010), (Fig. 1). Las bacteriolisinas (antiguamente bacteriocinas de la clase III) (Tabla 6), son proteínas antimicrobianas de gran tamaño y lábiles al calor (Rea y col. 2011). El ejemplo más estudiado hasta ahora corresponde a la lisostafina, bacteriocina producida por especies del género *Staphylococcus*, actúa hidrolizando la pared celular de la bacteria sensible (Bastos y col., 2010). En la Fig.1, se esquematiza el modo de acción de diferentes bacteriocinas.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 1. Modo de acción de las bacteriocinas producidas por BL (Cotter y col., 2005)

El espectro antimicrobiano de una bacteriocina se define como el conjunto de cepas sensibles a una determinada bacteriocina. Algunas bacteriocinas pueden presentar actividad solo frente a especies estrechamente relacionadas con la cepa productora (espectro reducido), mientras que otras frente a especies de diferentes géneros (amplio espectro) (Bastos y col., 2010). Asimismo, otras bacteriocinas son capaces de inhibir diversos microorganismos Gram positivos y algunos Gram negativos (Nissen-Meyer y col., 2009; Piper y col., 2009).

I.8.a Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705

L. curvatus CRL705, aislado a partir de embutidos artesanales argentinos (Vignolo y col., 1986), produce lactocina 705 (clase IIb), bacteriocina de dos componentes, y lactocina AL705 compuesto antimicrobiano con capacidad anti-*Listeria* (Vignolo y col., 1993; Castellano y col., 2003). Recientemente, la secuenciación del genoma de *L. curvatus* CRL705 mostró la presencia de genes para la producción de 5 bacteriocinas: lactocina 705, sakacina P, sakacina Q, sakacina X, y sakacina T (Hebert y col., 2012). Lactocina 705, cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos (*lac705* α y *lac705* β) de 33 residuos aminoacídicos cada uno, fue caracterizada bioquímica y genéticamente (Palacios y col., 1999; Cuozzo y col., 2000). La caracterización genética así como su mecanismo de acción frente a organismos blanco demostró que lactocina 705 ejerce su acción inhibitoria mediante la disipación del potencial de membrana y el gradiente de pH provocando la inmediata liberación de K⁺ y fosfato inorgánico, conduciendo finalmente a la muerte celular (Castellano y col., 2003). Ninguno de los dos péptidos (*lac705* α y *lac705* β) por separado posee efecto inhibitorio y la evaluación del rol de los mismos en la actividad antimicrobiana demostró que el péptido *lac705* α es responsable del reconocimiento a nivel de membrana del organismo indicador, mientras que el *lac705* β es el péptido activo sobre la misma (Cuozzo y col., 2003). La aplicación de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) permitió tener evidencias acerca del mecanismo de acción de cada péptido,

demostrando que ambos presentaban habilidad para interactuar con las membranas liposómicas aunque a diferentes niveles de la bi-capa. Mientras que el péptido lac705 α interactúa con la región interfacial induciendo deshidratación, lac705 β ejerce interacción solamente sobre la porción hidrofóbica sugiriendo la formación de un oligómero transmembrana (Castellano y col., 2007). La capacidad anti-*Listeria* de *L. curvatus* CRL705 ha sido denominada lactocina AL705 (Castellano y col., 2004; Castellano y Vignolo, 2006), la que podría corresponder a sakacina P o sakacina X, cuyos genes están presentes en el genoma de *L. curvatus* CRL705 y poseen capacidad anti-*Listeria* (clase IIa), (Eijsink y col., 1998; Vaughan y col., 2001, 2003). Dado que en este trabajo de tesis doctoral no se han realizado estudios utilizando sakacina P y sakacina X en forma separada, sino un extracto de bacteriocinas concentradas obtenido a partir de *L. curvatus* CRL705, el término “lactocina AL705” será usado para referirnos a la capacidad anti-*Listeria* del extracto.

I.8.b Purificación de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705

En vista de la aplicación de las bacteriocinas en alimentos, un requisito clave es la obtención de estos péptidos purificados y en gran cantidad. Debido a que las bacteriocinas son producidas en el medio de cultivo, la mayoría de las estrategias de purificación comienzan con una etapa de concentración que incluye la precipitación con sulfato de amonio o adsorción dependiente del pH en células muertas, entre otras metodologías (Guyonnet y col., 2000). Luego del proceso de concentración se lleva a cabo alguna etapa adicional para una mayor purificación de la bacteriocina. Entre los métodos de purificación se aplican diversas técnicas cromatográficas como el intercambio iónico (Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra y col., 2004), interacción hidrofóbica (Mauriello y col., 2004), permeación en gel (Bizani y col., 2005; Guyonnet y col., 2000), fase reversa (Yamazaki y col., 2005) y filtración a través de membranas (Cuozzo y col., 2001). Sin embargo, estos métodos de purificación resultan tediosos y requieren de mucho tiempo para su realización. Asimismo, debido a los bajos porcentajes de proteína recuperada luego de las

varias etapas de purificación (Guyonnet y col., 2000), existe una tendencia a purificar bacteriocinas usando el menor número de pasos posibles (Callewaert y De Vuyst, 1999; Uteng y col., 2002). Las propiedades anfífilas de las bacteriocinas de clase II, a la que pertenecen lactocina 705 y AL705, pueden aprovecharse para separar dichos péptidos en la interfase de líquidos inmiscibles (Burianek y Yousef, 2000) o por medio de la interacción con matrices con propiedades hidrofóbicas (Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra y col., 2004). El método de purificación más adecuado será aquel que presente mayor rendimiento de actividad antimicrobiana al final de la purificación y pueda llevarse a cabo en el menor tiempo posible.

I.8.c Cuantificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705

Una dificultad en el estudio de las bacteriocinas es la exacta cuantificación del compuesto antimicrobiano producido utilizando métodos basados en la inhibición de la cepa sensible (Pongtharangkul y Demirci, 2004, Papagianni y col., 2006). En este sentido, el ensayo de difusión en agar, similar a un antibiograma, representa un método fácil y de rápida ejecución, ya que se basa en la medición de áreas de inhibición de una cepa indicadora sembrada en una placa de Petri. En este experimento el tamaño del área de inhibición es el resultado de la difusión del antimicrobiano y la tasa de crecimiento del organismo indicador, existiendo una relación lineal entre el área de inhibición y el \log_{10} de la concentración del agente antimicrobiano (Pongtharangkul y Demirci, 2004). Los resultados de inhibición pueden ser afectados por factores como la sensibilidad de la cepa indicadora, cantidad de agar y surfactante utilizado en el medio semisólido, así como la pre-difusión del agente antimicrobiano. En la bibliografía se encuentran documentados diversos estudios para aumentar la difusión del antimicrobiano en el medio semisólido y en consecuencia mejorar la sensibilidad y precisión del método de difusión en agar. Se estudió la influencia de diferentes concentraciones de agente surfactante (Tween 80 o Tween 20) en el medio de cultivo así como la profundidad y concentración del agar utilizada (Mocquot y

Lefebvre, 1956, Wolf y Gibbons, 1996); se evaluó el agregado de una etapa de pre-difusión mediante refrigeración estudiando el efecto sobre diferentes microorganismos indicadores (Rogers y Montville, 1991, Pongtharangkul y Demirci, 2004). Para cada estudio en particular, la mejor combinación de parámetros fue aquella que permitió aumentar la precisión y exactitud del método de difusión en agar.

I.9 Nociones de Adsorción

Como se mencionó anteriormente, para la obtención de un material con actividad antimicrobiana, el compuesto activo puede incluirse dentro del polímero o adsorberse en la superficie del mismo. El fenómeno de adsorción de péptidos y proteínas en superficies cumple un rol fundamental en biología y diversas aplicaciones bioquímicas, farmacéuticas y médicas (Lutanie y col., 1992; Hlady y Buijs, 1996; Nakanishi y col., 2001; Gray, 2004). Particularmente, la adsorción de bacteriocinas en diversas superficies ha sido estudiada debido a su potencial aplicación en dispositivos de uso médico y materiales activos para alimentos (Daeschel y col., 1992; Lakamraju y col., 1995; Guerra y col., 2005a,b; Tai y col., 2008; Schilke y McGuire, 2011).

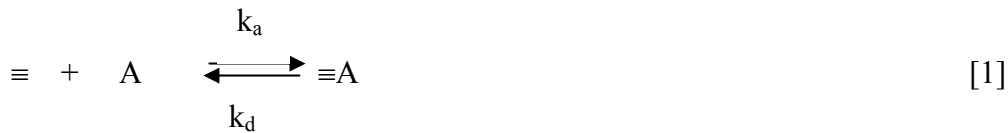
Los primeros estudios sobre adsorción se realizaron sobre superficies hidrofílicas (metales u óxidos metálicos) y gases, siendo fácilmente extendidos a la adsorción desde soluciones. Las aplicaciones en catálisis impulsaron estos estudios y este avance permitió la descripción de las superficies y modelado de su interacción con agua y otras sustancias. Podemos distinguir dos comportamientos límites de adsorción, la fisisorción y la quimisorción, aunque es frecuente observar comportamientos intermedios. La adsorción física o fisisorción se caracteriza porque las fuerzas que mantienen unidas las moléculas a la superficie son interacciones del tipo de Van der Waals (interacciones dipolares, dispersión y/o inducción). Estas fuerzas son débiles y como resultado los valores de las entalpías de adsorción son bajas (ΔH_{ads} aprox. 20-40 kJ/mol). Por el contrario, en la quimisorción las moléculas adsorbidas se unen a la superficie por uniones de tipo

covalente, esto implica que las uniones son más firmes y las entalpías de adsorción más elevadas (ΔH°_{ads} 100-500 kJ/mol) (http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/Superficies_Solidas_A.pdf).

I.9.a El modelo de Langmuir

Langmuir (1918) propuso la adsorción química, sentando las bases de su modelo: sitios específicos en los cuales se puede producir la unión entre superficie adsorbente y molécula adsorbida. La adsorción de una sustancia en una superficie puede ser descrita por una isoterma de adsorción. Si se coloca una superficie adsorbente en contacto con una solución conteniendo un adsorbato a una dada temperatura, se puede observar una disminución de la concentración del adsorbato en solución, en función del tiempo. Esta disminución se hace constante para un determinado tiempo de contacto entre la superficie y la solución cuando el sistema alcanza el equilibrio de adsorción. Una isoterma de adsorción se construye poniendo en contacto el adsorbente con distintas concentraciones de adsorbato en solución, a una temperatura determinada y graficando la cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio, en función de la concentración de adsorbato remanente en la solución.

De acuerdo al modelo de Langmuir la adsorción implica una unión química entre sitios activos de la superficie y la molécula adsorbida, condicionando este tipo de adsorción a una monocapa. También se asume que no existen interacciones laterales entre las moléculas de adsorbato unidas a la superficie. Por otra parte, la idea de sitios activos es explicable aún en sólidos constituidos por un solo tipo de átomos, a partir de las imperfecciones que presentan las superficies de los sólidos. La existencia de esquinas, escalones y átomos aislados da lugar a átomos con distinto grado de saturación en sus valencias y por lo tanto con distinta reactividad frente a los posibles adsorbatos. El modelo de Langmuir para la adsorción de una sustancia A se puede representar sencillamente como:



Donde \equiv representa a los sitios libres de la superficie, $\equiv A$, los sitios cubiertos por A, y k_a y k_d a las constantes de adsorción y desorción respectivamente. Si la fracción de sitios cubiertos se define por θ , la fracción de sitios libres será $(1 - \theta)$. Podemos entonces expresar las velocidades de adsorción y desorción según las ecuaciones [2] y [3],

$$v_a = k_a(1 - \theta)[A] \quad [2]$$

$$v_d = k_d\theta \quad [3]$$

Donde $[A]$ es la concentración molar de A en la solución.

En el equilibrio, ambas velocidades son iguales y de ello se obtiene:

$$\frac{\theta}{(1 - \theta)} = \frac{k_a}{k_d}[A] = K_L[A] \quad [4]$$

Siendo K_L la constante de Langmuir.

Despejando la fracción de sitios ocupados se obtiene la expresión de la isoterma de Langmuir

$$\theta = \frac{K_L[A]}{1 + K_L[A]} \quad [5]$$

Dado que θ es la fracción de sitios ocupados puede escribirse como:

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_{m\acute{a}x}} \quad [6]$$

Donde Γ y $\Gamma_{m\acute{a}x}$ son, respectivamente, el número de posiciones ocupadas y el número de posiciones máximo disponible para la adsorción. De esta manera la expresión de la isoterma de Langmuir para la adsorción de una sustancia A desde una solución queda expresada como:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{m\acute{a}x}K_L[A]}{1 + K_L[A]} \quad [7]$$

Esta expresión predice que la isoterma presentará un aumento lineal de la adsorción en función de la concentración de la solución para bajas concentraciones de adsorbato y que mostrará saturación (meseta) a altas concentraciones del mismo (Glasstone y Lewis, 1978; Gurasimov y col., 1986). El modelo de Langmuir permite además modelar casos de adsorción competitiva y su aplicación permite obtener las leyes cinéticas de reacciones superficiales y explicar mecanismos de acción catalítica.

I.9.b Comparación de datos con modelos de adsorción

Aún no cumpliendo algunos de los postulados del modelo, existen casos experimentales reportados en la literatura que son modelables, incluso casos de fisiorción y adsorción hidrofóbica (ver más adelante), por una expresión tipo Langmuir, de manera que la ecuación [7] es utilizada aún cuando el modelo no es conceptualmente aplicable (Daeschel y col., 1992; Krisdhasima y col., 1992; Roach y col., 2005). En dichos casos, la ecuación de Langmuir se utiliza como una ecuación empírica haciendo la salvedad del incumplimiento de los postulados del modelo.

A diferencia del modelo de Langmuir, la fisiorción, originada en fuerzas de Van der Waals, permite explicar la presencia de multicapas. Esto se debe a que las fuerzas de Van der Waals son de largo alcance y se extienden más allá de la primera capa de moléculas adsorbidas, mientras que la unión química característica de Langmuir se agota al completarse la primera capa. La aparición de capas múltiples se manifiesta en la isoterma de adsorción por el hecho de no alcanzarse una meseta (saturación) a altas concentraciones de adsorbato. Sin embargo, en algunos casos se puede observar la aparición de una meseta durante un rango de concentraciones bajas de adsorbato, seguida de un aumento de la concentración adsorbida, para un rango de concentraciones altas. En estos casos se postula una adsorción tipo Langmuir que genera una monocapa, seguida de una fisiorción débil que genera multicapas (Guerra y col., 2005a,b) o un reacomodamiento de los adsorbatos, debido a la aparición de interacciones laterales entre las especies adsorbidas a elevadas concentraciones (Roach y col., 2005).

I.9.c Adsorción de proteínas y péptidos en superficies

Debido a su naturaleza anfifílica, las proteínas y péptidos presentan gran estabilidad en su estado adsorbido, siendo este fenómeno de adsorción de gran interés en diferentes aplicaciones tecnológicas (Hlady y Buijs, 1996; Gray, 2004; Rabe y col., 2011). Cualquiera sea el mecanismo y la cinética de adsorción, a temperatura y presión constante, este proceso solo ocurre espontáneamente si la energía libre de Gibbs del sistema [8] decrece,

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S < 0 \quad [8]$$

Donde H, S y T son la entalpía, entropía y temperatura absoluta y Δ_{ads} indica el cambio en la función termodinámica de estado resultante del proceso de adsorción.

Durante la adsorción de una proteína en una superficie, pueden ocurrir interacciones de tipo hidrofóbica, en este tipo de interacción la fuerza impulsora tiene naturaleza entrópica. La deshidratación de componentes hidrofóbicos de las proteínas en una solución acuosa, resulta en una disminución de la energía libre de Gibbs del sistema, debido a la ganancia en entropía por parte de las moléculas de agua liberadas de estos componentes. A su vez, las proteínas cambian su conformación de forma que los residuos hidrofóbicos se ponen en contacto con la superficie hidrofóbica (Kleijn y Norde, 1995).

Entre las técnicas utilizadas para cuantificar proteínas adsorbidas a una superficie se pueden citar la elipsometría, resonancia de plasmones superficiales, determinaciones con microbalanza de cristal de cuarzo y métodos analíticos como el de Lowry o determinaciones de absorbancia entre otros (Norde y col., 1986; Sarkar y Chatteraj, 1993; Roach y col., 2005; Karlsson y col., 2005; Wei y col., 2007). También se encuentran en la literatura, técnicas que se enfocan específicamente en los cambios de estructura de las proteínas adsorbidas, tales como la espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (IR-RTA) y el dicroísmo circular (DC) (Rabe y col., 2011).

En el caso de adsorción de bacteriocinas en superficies, la información disponible no es tan abundante y los métodos utilizados para su estudio incluyen elipsometría (Daeschel y col., 1992; Bower y col., 1995; Tai y col., 2008) así como técnicas indirectas de cuantificación que tienen en cuenta la actividad biológica de estos compuestos peptídicos (Joosten y Nuñez, 1995; Bower y col., 1995; Guerra y col., 2005a,b; Ibarguren y col., 2010b). Sin embargo, mediante las técnicas biológicas solo pueden cuantificarse concentraciones de péptidos activos, quedando fuera del alcance aquellos que pudieran haber sufrido alteración en su actividad antimicrobiana por cambios conformacionales luego de la adsorción (Roach y col., 2005; Drider y col., 2006; Nissen-Meyer y col., 2011).

I.10 Materiales activos y su desempeño

La tecnología del envase activo involucra interacciones entre el alimento, el material que forma el envase y la atmósfera dentro del mismo. La mayoría de los sistemas de envases están formados por el material de envase, el alimento, y un espacio entre el alimento y el envase (espacio de cabeza). De esta manera, en la mayoría de los alimentos envasados se puede encontrar un sistema compuesto por el envase/alimento o envase/espacio de cabeza/alimento (Fig. 2) (Han, 2000). En estos sistemas se produce un fenómeno de transferencia de masa (migración) que involucra la difusión de una sustancia desde el material al alimento y su posterior partición o disolución en el último (Fig. 2). En un envase activo, la efectividad antimicrobiana estará ligada a la velocidad y cantidad de agente que migra a la superficie del alimento; parámetros que se rigen a su vez por el tipo de polímero, grado de entrecruzamiento, tipo de alimento o simulante de alimentos, y naturaleza del compuesto activo (Kim y col., 2002, Buonocore y col., 2003).

Los componentes del alimento también pueden interferir en la actividad antimicrobiana de un agente activo (Aasen y col., 2003; Silveira y col., 2007), en consecuencia es esencial conocer las características del alimento y estudiar las interacciones de sus componentes con la sustancia antimicrobiana adicionada en el envase activo. Asimismo, en el diseño de un material activo

antimicrobiano debe tenerse especial cuidado en que las propiedades iniciales del polímero (Tabla 2) no se vean afectadas por la adición del componente activo.



Figura 2. Envases para alimentos y el fenómeno de migración (Han, 2000)

I.11 Seguridad y aspectos legales de los envases

Cuando se desarrolla un material activo antimicrobiano, se debe considerar que el mismo sea apto para su uso en alimentos. Para esto es esencial que el material cumpla con las normas vigentes de aptitud sanitaria. En USA existen dos instancias para la aprobación de una sustancia activa por la FDA: (i) un proceso de notificación de contacto con alimentos y (ii) un proceso de petición como aditivo alimentario. El material de envase que no tiene un efecto directo en el alimento puede ser aprobado por el primer proceso, en cuyo caso el fabricante del envase debe notificar a la FDA para comercializar el nuevo producto por lo menos 120 días antes de su introducción al mercado. Sin embargo, el material que presente un efecto antimicrobiano en el alimento a través de la migración o liberación controlada del agente activo necesita pasar un

proceso de petición como aditivo de alimentos (Cho y col., 2009). En la Argentina, los materiales que estarán en contacto con alimentos deben seguir los lineamientos de las Normas Mercosur (Resolución Mercosur GMC. N° 32/07), que se actualizan de acuerdo a las Normas dictadas por la Comunidad Europea (Reglamento CE 1935/2004). Aunque no existe aún legislación Mercosur vigente para materiales activos, la Comunidad Europea publicó en el año 2009 la normativa correspondiente a materiales activos e inteligentes que estarán en contacto con alimentos (Reglamento CE 450/2009), como consecuencia de las tendencias mundiales en la búsqueda de nuevas herramientas de preservación de alimentos. Asimismo, la legislación vigente en Argentina establece la metodología analítica y valores de migración total por encima de los cuales un material no resulta apto sanitariamente (Resolución Mercosur GMC 32/10 y 56/92). Esta normativa especifica el uso de sustancias (simulantes de alimentos) de modo de reproducir las condiciones normales o previsibles de almacenamiento y de acuerdo al tipo de alimento para el cual el envase está destinado. Así por ejemplo para productos cárnicos procesados como la salchicha, se debe estudiar la migración en simulante de alimentos graso (aceite de girasol o una solución de etanol al 95%) y acuoso (agua destilada o des-ionizada).

ANTECEDENTES

Lactobacillus curvatus CRL705, productor de lactocina 705 y AL705, ha sido ampliamente utilizado como cultivo bioprotector en alimentos cárnicos (Castellano y col., 2004, 2008, 2010; Castellano y Vignolo, 2006; Vignolo y col., 2008;). Tanto lactocina 705 como AL705 mostraron estabilidad térmica hasta temperaturas de 70°C y su actividad antimicrobiana resultó óptima en un rango de pH comprendido entre 3.0 y 6.0 (Tesis doctoral Palacios, 2000; Tesis doctoral Castellano, 2005), características que permitirían la incorporación de las bacteriocinas en materiales poliméricos con el fin de obtener un plástico capaz de controlar el crecimiento de patógenos y contaminantes de alimentos cárnicos. Nisina, producida por *Lactococcus lactis*, se considera generalmente aceptada como segura (GRAS) y ha sido aprobada para este fin por la FDA y WHO. Esta bacteriocina es el péptido antimicrobiano más utilizado en películas poliméricas, sola o en combinación con otros antimicrobianos (Joerger, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Se establece como objetivo de este trabajo la obtención y caracterización de materiales activos antimicrobianos conteniendo bacteriocinas producidas por BL (lactocina 705, AL705 y nisina) a los efectos de controlar la microflora patógena y contaminante presente en productos cárnicos listos para el consumo (RTE).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Obtención de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 para su incorporación en materiales poliméricos
- 2- Obtención de películas poliméricas activadas con bacteriocinas
- 3- Adsorción de lactocina 705 en la película multicapa y su interacción con AL705 y los metabolitos producidos por *L. curvatus* CRL705 durante el proceso de adsorción
- 4- Caracterización de las películas activas obtenidas
- 5- Eficiencia inhibitoria frente a microorganismos indicadores en salchichas como modelo de alimento cárnico RTE

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Lactobacillus curvatus CRL705 (previamente identificado como *L. casei* CRL705), productor de lactocina 705 y lactocina AL705 y *Lactobacillus plantarum* CRL691, usado como cepa sensible frente a lactocina 705, fueron aislados de embutidos artesanales argentinos (Vignolo y col., 1986, 1993). También fueron usadas las cepas de *Lactobacillus curvatus* SAC-7, obtenida a partir de *Lactobacillus curvatus* CRL705 e incapaz de producir lactocina 705 y AL705 y *L. curvatus* CRL1579 derivada de CRL705 y productora solamente de lactocina AL705 (Cuozzo, 2002). Todas las cepas de *Lactobacillus* fueron cultivadas a 30°C en caldo MRS (Britania, Argentina). *Listeria innocua* 7, cepa indicadora de la actividad de lactocina AL705, fue suministrada por la Unité Recherche Laitière et Génétique Appliquée, INRA (Francia) y cultivada a 30°C en caldo trypticase soy broth (TSB; BBL, Cockeysville, MD) con 0.5% de extracto de levadura. Todas las cepas se conservaron a -20°C en 15% de glicerol.

II.2 Obtención de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705

II.2.a Precipitación con sulfato de amonio y posterior liofilización

El sobrenadante libre de células de un cultivo *overnight* de *L. curvatus* CRL705 inoculado al 1%, fue precipitado con sulfato de amonio (44%) agitando durante 12 horas (Saavedra y col., 2004) y centrifugado a 10000 rpm durante 20 min. El pellet de bacteriocinas concentradas (BC) obtenido fue liofilizado y posteriormente re-suspendido en agua para ser usado como solución acuosa de bacteriocinas concentradas (SABC).

II.2.b Extracción en fase sólida usando isopropanol como eluyente

La SABC fue inyectada en un cartucho de extracción en fase sólida (Varian SPE-C18). Se llevaron a cabo etapas de lavado y elución usando 4 volúmenes de soluciones de acetato de amonio 200 mM e isopropanol en diferentes concentraciones:

Etapas de lavado:

1. Acetato de Amonio 200 mM
2. Acetato de Amonio 200 mM + 10% Isopropanol
3. Acetato de Amonio 200 mM + 30% Isopropanol

Etapas de elución:

4. Acetato de Amonio 200 mM + 40% Isopropanol
5. Acetato de Amonio 200 mM + 50% Isopropanol

Se colectaron las fracciones obtenidas en la etapa de elución y se utilizaron como solución de bacteriocinas obtenida por extracción en fase sólida (SBEFS).

II.2.c Extracción con isopropanol

La SABC fue adicionada con NaCl hasta saturación (NaCl 6,16 M) y se realizaron tres extracciones con isopropanol usando $\frac{1}{4}$ del volumen inicial de solución, colectándose las tres fracciones. La solución obtenida fue usada como solución isopropanólica de bacteriocinas parcialmente purificadas (SIBPP).

En todas las etapas de purificación se determinó la actividad antimicrobiana de las soluciones obtenidas frente a *L. plantarum* CRL691 (lactocina 705) y *L. innocua* 7 (lactocina AL705), conservándose solo las fracciones activas.

II.2.d Control biológico sin bacteriocinas

Para verificar si la actividad antimicrobiana se debía a la presencia de las bacteriocinas y no a los productos del catabolismo del microorganismo productor, se obtuvo un blanco biológico de un cultivo *overnight* de *L. curvatus* SAC-7, a partir del cual se llevó a cabo una precipitación con sulfato de amonio (ver Sección II.2.1), obteniendo una solución acuosa de impurezas concentradas (SAIC). Este blanco se utilizó como solución control para la activación de películas (ver Sección II.8.1.a y II.8.2). Las impurezas generadas por el microorganismo productor pueden involucrar metabolitos producidos durante su crecimiento, así como componentes presentes en el medio de cultivo.

II.2.e Lactocina 705 sintética

Lactocina 705 sintética (S-705) se obtuvo a partir de la combinación de sus péptidos Lac705 α y Lac705 β , en una relación 1:4 (Cuozzo y col., 2003). Ambos péptidos fueron sintetizados según lo reportado por Palacios y col. (1999) y Cuozzo y col. (2000).

II.3 Cuantificación de la actividad antimicrobiana en solución. Determinación del tiempo de difusión a 4°C.

La actividad antimicrobiana fue determinada mediante el método de difusión en agar frente a las cepas sensibles. En una placa de Petri se colocaron 10 ml de agar semisólido (MRS para *L. plantarum* CRL691 y TSB + 0.5% de extracto de levadura + 1% de Tween 80 para *L. innocua* 7). Se realizaron pocillos de aproximadamente 5 mm de diámetro colocándose en cada uno de ellos 15 μ l de las diluciones seriadas de la solución de bacteriocinas dejándose secar a temperatura ambiente. Luego de incubar las placas (30°C, 18 h) se observaron las áreas de inhibición. El título de bacteriocinas expresado como unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml) se definió como la

inversa de la última dilución que presentó un halo frente a la cepa sensible. Cada determinación se llevó a cabo por duplicado.

Para determinar el efecto de la predifusión a 4°C sobre la precisión y exactitud del método, se colocaron en los pocillos diferentes concentraciones de SABC y las placas sembradas se incubaron inicialmente a 4°C durante 2, 4, 6, 8 y 24 h y luego 18 h a 30°C, se compararon las pendientes de las rectas de regresión obtenidas al graficar el radio de inhibición en función del logaritmo del título de las bacteriocinas. También se determinó la influencia de la predifusión a 4°C sobre el crecimiento de las cepas sensibles mediante los siguientes ensayos:

Ensayo 1: la solución de bacteriocinas (15 µl) y sus diluciones fueron colocadas en pocillos realizados en las placas de Petri sembradas con el microorganismo sensible, se dejaron secar e incubaron a 30°C durante 18 h (método convencional).

Ensayo 2: luego de colocar 15 µl de solución de bacteriocina y sus diluciones en los pocillos, las placas sembradas fueron almacenadas a 4°C durante 24 h para permitir la predifusión de las bacteriocinas incubándose luego a 30°C durante 18 h.

Ensayo 3: las placas sembradas con las cepas sensibles fueron almacenadas a 4°C durante 24 h, agregándose posteriormente 15 µl de la solución de bacteriocina y sus diluciones en los pocillos, se dejaron secar e incubaron a 30°C durante 18 h.

II.4 Cuantificación de las bacteriocinas en solución

Mediante el método de difusión en agar estandarizado en el punto anterior se determinó la actividad de las bacteriocinas en solución y se expresó en UA/ml. Debido a la baja sensibilidad del método de difusión en agar, para los estudios cinéticos y de adsorción de lactocina 705, en los que se requirió trabajar con concentraciones muy bajas de bacteriocina (ver II.8.c.3), la actividad de lactocina 705 se determinó mediante un método turbidimétrico utilizando *L. plantarum* CRL691 como microorganismo indicador. Este método se basa en la inhibición del microorganismo sensible, causada por la bacteriocina y sus diluciones seriadas (Cabo y col., 1999). Un volumen de

lactocina 705 sintética (S-705) de una determinada concentración y sus diluciones seriadas se mezclaron, en tubos diferentes, con un volumen de la cepa indicadora (*L. plantarum* CRL691, 10^5 UFC/ml) resuspendida en caldo MRS. Los tubos se incubaron a 30°C durante 16 h, el crecimiento microbiano se midió mediante un espectrómetro a 600 nm (Cuozzo y col., 2003). Cada tubo se comparó con un control en el que se utilizó agua destilada en lugar de S-705. Se calculó la proporción de inhibición según la ecuación [9]

$$I = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \quad [9]$$

Donde A_s es la absorbancia (600nm) de la muestra y A_0 la absorbancia del control.

La actividad de la bacteriocina se calculó como unidades de bacteriocina (UB, cantidad de bacteriocina necesaria para inhibir el 50% del crecimiento microbiano), que se puede obtener por interpolación de la curva dosis-respuesta correspondiente a cada concentración y sus diluciones [10]

$$I = K \left(\frac{1}{1 + e^{r(m-D)}} - \frac{1}{1 + e^{rm}} \right) \quad [10]$$

Donde I es la proporción de inhibición, K, el máximo de inhibición, D, la dosis (ppm), r, el coeficiente de inhibición específico (dimensiones: inversa de la dosis), y m la abscisa donde $I=K/2$, es decir la UB (Cabo y col., 1999).

Se construyó una curva standard a partir de la inversa del factor de dilución correspondiente a 1 BU ($I=K/2$) versus la concentración de lactocina 705 ($\mu\text{g/ml}$). (Fig. 3).

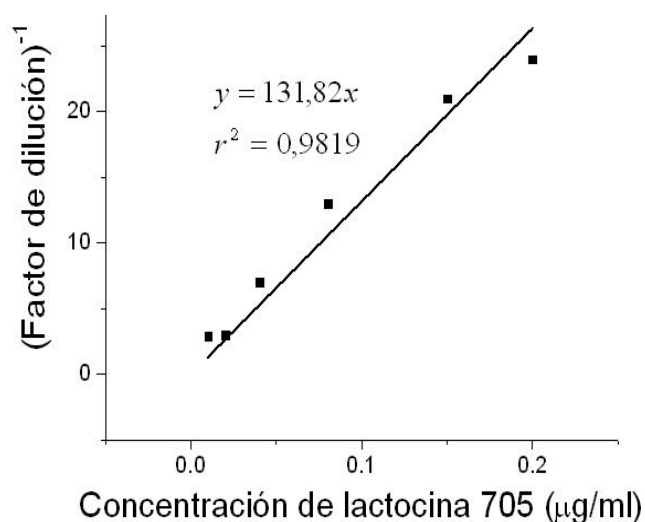


Figura 3. Curva standard utilizada para calcular concentraciones de lactocina 705 en medio líquido

II.5 Materiales poliméricos

II.5.a Películas comerciales

Se utilizaron películas multicapa T60XXB y T73XXB provistas por Cryovac (Sealed Air, Argentina). Las características de estos materiales, empleados comercialmente como fondo y tapa para envases de salchichas respectivamente, se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de las películas de cara interna de PEBDL.

Película	Uso	Cara en contacto con el alimento	Capa barrera	Otras capas
T60XXB	Fondo termoformable para envasar salchichas	Polietileno de baja densidad lineal (PEBDL)	Etilen vinil alcohol (EVOH)	Polietileno, poliamida, polipropileno (PE-PA-PP)
T73XXB	Tapa para envasar salchichas	Polietileno de baja densidad lineal (PEBDL)	Etilen vinil alcohol (EVOH)	Poliamida y polietileno (PA-PE)

La composición estructural de la película T60XXB a partir de una imagen de microscopía óptica (Fig. 4a) muestra las cinco capas de la misma; la cara interna de Polietileno de baja densidad lineal (PEBDL) tiene un espesor de 35 µ, la cara externa de polipropileno (PP) 25 µ, y el resto de la

estructura 40 μ . La película T73XXB presenta 4 capas, la cara interna de PEBDL de 10 μ , una cara externa de polietileno de 25 μ y el resto de la estructura de 40 μ (Fig. 4b).

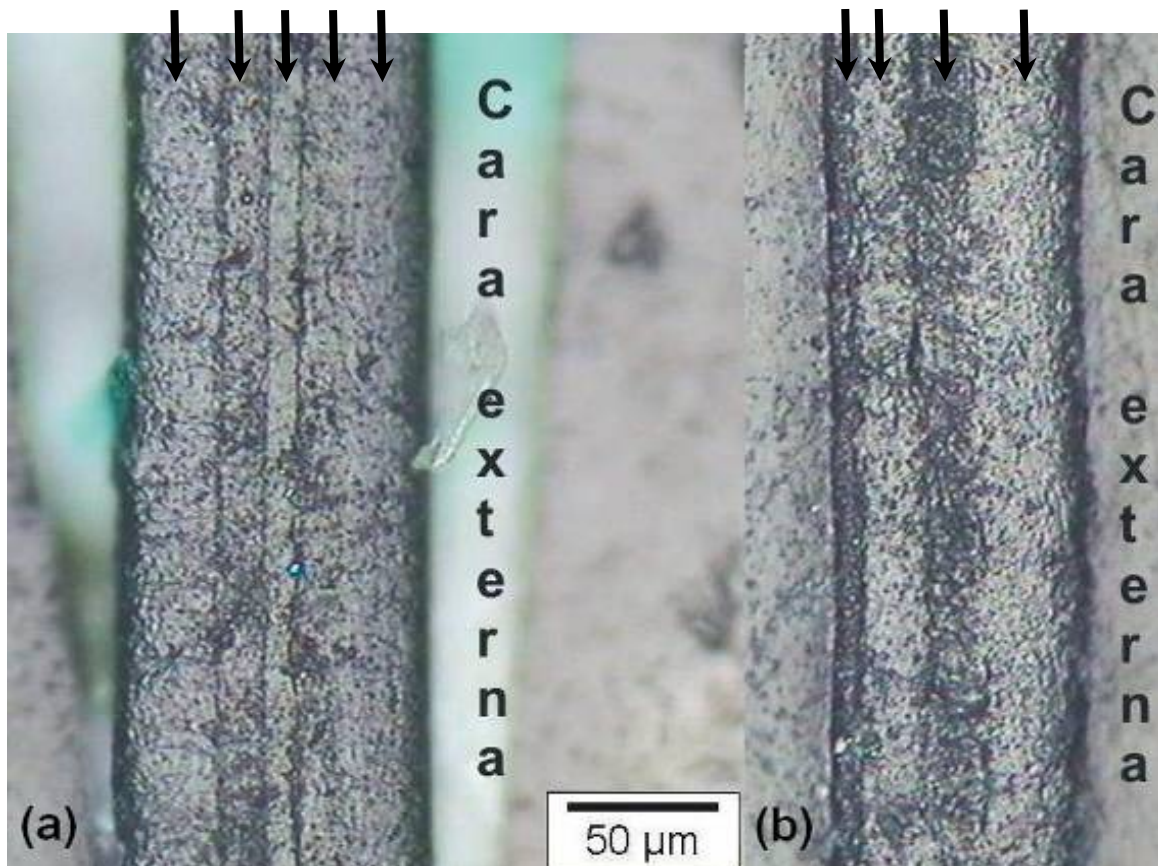


Figura 4. Imagen microscópica mostrando las capas presentes en las películas multicapas de cara interna de PEBDL (a) T60XXB y (b) T73XXB

II.5.b Película obtenida a partir de un recurso renovable de origen agroindustrial

Se usó proteína de trigo (gluten) para la obtención de la película a partir de recursos renovables. La obtención de la película se llevó a cabo a escala piloto por el método de casting: con un agitador mecánico (Heidolph RZR 2041) se mezclaron 17 g de gluten, 0.3 g de sulfito de sodio, 30 g glicerol y 45 ml de etanol, el pH de la mezcla se ajustó a 5.0 con ácido acético glacial y se agregó agua destilada hasta un volumen final de 200 ml. La solución obtenida se colocó en una cinta sinfín de Teflón[®] en un horno de circulación de aire forzado (velocidad de 1.65 m/seg a 50 °C, tiempo de residencia de 4 hs).

II.6 Soluciones utilizadas para la activación de las películas

El peso de una determinada cantidad de liofilizado activo como el obtenido en la Sección II.2, no garantiza que su actividad antimicrobiana (expresada como título) sea siempre la misma, fundamentalmente debido a la variación introducida en la determinación de actividad antimicrobiana, por el hecho de trabajar con sistemas biológicos. Es por ello que se determinó la actividad antimicrobiana (título) frente a las cepas indicadoras, cada vez que se utilizó un liofilizado activo para preparar una solución. A continuación se presentan las diferentes soluciones (con sus respectivos títulos frente a *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7) utilizadas para experimentos de activación de las películas (Tabla 8).

II.7 Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas activas

Se colocaron círculos de 1 cm de diámetro de la película activada y el control sin bacteriocinas en placas preparadas con medio agar semisólido (0.7%), sembradas con las cepas sensibles. Luego de 18 hs de incubación a 30 °C, la actividad antimicrobiana de las películas se puso en evidencia por la aparición de halos de inhibición que fueron medidos con un calibre (Ruhlmann® 0-150mm Vernier Caliper, resolución 0.02 mm) y expresados como áreas de inhibición relativa (áreas de inhibición/área de las películas).

II.8 Activación de las películas poliméricas

II.8.a Película multicapa

II.8.a.1 Selección del método de activación

Se utilizó como solución de activación SABC (Tabla 8) y el control correspondiente sin bacteriocinas de SAIC.

Tabla 8. Soluciones utilizadas en los diferentes experimentos desarrollados para la activación de las películas.

Solución utilizada	Concentración (% p/v)	Título (UA/ml)		Experimento en el que se utilizó la solución
		705	AL705	
SABC	1	4267	8533	II.8.1.a Selección del método de activación
SABC	0.1*	267 ¹	533 ¹	I.8.b.1 Selección de la solución de activación. Diseño factorial*
		133 ²	267 ²	
		133 ⁵	133 ⁵	
		267 ¹²	1067 ¹²	
		133 ²⁴	533 ²⁴	
	1*	1067 ¹	2133 ¹	
		1067 ²	4267 ²	
		4267 ⁵	4267 ⁵	
		1067 ¹²	4267 ¹²	
		2133 ²⁴	4267 ²⁴	
SIBPP	0.1 ^{*,**}	267 ¹	267 ¹	I.8.b.1 Selección de la solución de activación. Diseño factorial
		267 ²	267 ²	
		267 ⁵	267 ⁵	
		267 ¹²	267 ¹²	
		533 ²⁴	1067 ²⁴	
	1 ^{*,**}	2133 ¹	2133 ¹	
		4267 ²	2133 ²	
		2133 ⁵	2133 ⁵	
		2133 ¹²	4267 ¹²	
		2133 ²⁴	2133 ²⁴	
SABC	0.01	67	400	II.8.c.1 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa
	0.05	267	3200	
	0.1	267	2133	
	0.5	1600	8533	
	1	4267	12800	
SABC	0.1	267	2133	II.8.d.1 Influencia de la temperatura en la obtención de la película activa
				II.8.e.1 Estabilidad y rendimiento de la solución de activación
Nisaplin®	1	8533	4267	II.8.f.1 Obtención de la película T60XXB activada con nisina
	0.1	267	200	

	0.01	67	400	II.8.2 Activación de la película obtenida a partir de un recurso renovable. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de lactocina 705 y lactocina AL705
SABC	0.1	267	2133	
	1	4267	12800	

*La investigación a través de un diseño factorial requirió que para cada combinación de tipo de solución, concentración y tiempo de activación, se preparara una solución independiente, por lo tanto en cada combinación se obtuvieron soluciones de título diferente, los superíndices que acompañan los valores de título corresponden a los tiempos de contacto para los cuales se utilizó la solución de activación (ver Sección II.8.1.b).

** La concentración que se muestra corresponde a la de SABC que fue extraída con isopropanol (ver Sección II.2.3).

Método de contacto en bolsas. Se prepararon bolsas de 200 cm² con las películas de cara interna de PEBDL (Tabla 7) por termosellado (150°C, 1 seg y 2.5 Pa) usando una máquina termoselladora (TP-701S Heat Seal Tester, Tokyo, Japan). Dentro de cada bolsa se colocaron 46.9 ml de la solución de activación, se cerraron mediante clips y se agitaron durante 24 h.

Método de inmersión. Se sumergieron trozos de 4.5 cm² de la película T60XXB en 1.5 ml de la solución activa durante 24 h.

Método de contacto por flotación. Se hicieron flotar trozos de la película T60XXB (19.6 cm²) sobre 4.6 ml de la solución activa durante 24 h.

En todos los casos, luego de los respectivos tratamientos, las películas se lavaron con agua destilada estéril y se secaron a 50°C durante 10 min.

II.8.a.2 Selección de la solución de activación. Diseño factorial

Con el objetivo de seleccionar la solución de activación (SABC o SIBPP) y las condiciones apropiadas para la obtención de la película activa (concentración y tiempo de contacto de la película con la solución de activación), se desarrolló un diseño factorial cuyos factores fueron (i) tipo de solución (2 niveles: SABC y SIBPP), (ii) concentración (2 niveles: 0,1 y 1%) y (iii) tiempo (5 niveles: 1, 2, 5, 12 y 24 horas), (Tabla 9). La metodología del diseño factorial requirió para cada

combinación de factores y niveles la preparación de soluciones activas independientes. Los títulos de las soluciones utilizadas en este experimento se muestran en la Tabla 8.

Tabla 9. Diseño factorial desarrollado para la elección de las condiciones de activación de la película T60XXB

Solución de activación	Concentración (%)	Tiempo (hs)				
SABC	0.1	1	2	5	12	24
	1	1	2	5	12	24
SIBPP	0.1*	1	2	5	12	24
	1*	1	2	5	12	24

*la concentración que se muestra corresponde a la de SABC que fue extraída luego con isopropanol (Sección II.2.3.)

II.8.a.3 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa

A partir de la solución elegida en el punto anterior como adecuada para la activación, se prepararon varias diluciones de solución activa. Se evaluaron los títulos (expresados en UA/ml) de las mismas y se construyó una curva de UA/ml de cada bacteriocina en función de la concentración de solución activa; aquellas diluciones que guardaron una relación lineal entre título y concentración se utilizaron para activar la película multicapa. Se colocaron trozos de 19.6 cm² de la película T60XXB durante 5, 20, 60, 480 y 1440 min sobre 4.6 ml de las soluciones activas de diferentes concentraciones. La AIM se definió como el mínimo título de bacteriocinas en la solución de activación a partir del cual se obtuvo una película con actividad en toda su superficie (área de inhibición relativa ≥ 1). El ensayo se realizó por cuadruplicado.

II.8.a.4 Influencia de la temperatura en la obtención de la película activa

La película T60XXB se puso en contacto con la solución activa (Tabla 8) durante 1 h a diferentes temperaturas (20, 30 y 40°C), luego del lavado y secado se determinó la actividad de la misma frente a las cepas sensibles.

II.8.a.5 Estabilidad y rendimiento de la solución de activación

La estabilidad de la actividad antimicrobiana de la solución de activación (Tabla 8) en función del tiempo se determinó mediante la evaluación del título cuando la misma fue almacenada a -20°C tanto en su forma deshidratada (BC) como en la re-suspensión acuosa (SABC), por un período de 2 años. La posibilidad de utilización de la solución SABC en más de una activación fue evaluada poniendo en contacto tres películas (T60XXB) en forma secuencial con 4.6 ml de la misma solución. Luego del tratamiento se evaluó la actividad de las películas frente a las cepas sensibles.

II.8.a.6 Obtención de la película T60XXB activada con nisina

Debido a que nisina es la única bacteriocina aprobada como aditivo alimentario, a efecto comparativo se activó la película T60XXB con nisina, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7 y se comparó con la obtenida a partir de la SABC. Para tal fin se preparó una solución madre de nisina disolviendo 0.1 g de Nisaplin® (Danisco Argentina SA, Buenos Aires, Argentina) en HCl 0.02 N, se ajustó el pH a 2.5 mediante el agregado de NaOH 1N (en estas condiciones nisina presenta mayor solubilidad), (Question number EFSA-Q-2005-031, 2006). La solución obtenida se llevó a un volumen final de 10 ml (1% p/v) y a partir de esta se obtuvo una solución de Nisaplin® 0.1% p/v. Se determinó el título de ambas soluciones frente a las cepas sensibles (Tabla 8). La película T60XXB se activó mediante contacto por flotación durante 1 h a 30°C utilizando las soluciones de Nisaplin® 0.1 y 1% p/v. El ensayo se realizó por duplicado.

II.8.b Activación de la película obtenida a partir de un recurso renovable. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de lactocina 705 y lactocina AL705

La determinación de la CIM de la solución acuosa de bacteriocinas concentradas (SABC) se llevó a cabo mediante reemplazo del agua en la formulación de la película de gluten por soluciones activas (0.01, 0.1 y 1%) y SAIC 1% (control sin bacteriocinas); la película de gluten se obtuvo por casting. Se ensayó la actividad antimicrobiana de las películas obtenidas frente a las cepas sensibles. La CIM se definió como la mínima concentración de SABC a partir de la cual se obtuvo una película con actividad en toda su superficie frente a *L. plantarum* CRL691 y a *L. innocua* 7.

II.8.c Estudio de adsorción de lactocina 705 en la película multicapa y su interacción con AL705 y las impurezas producidas por *L. curvatus* CRL705

II.8.c.1 Adsorbente y adsorbatos

Se utilizó como adsorbente la película multicapa TXX60B. Se utilizaron como adsorbatos las bacteriocinas (lactocina 705 y lactocina AL705) y las impurezas de *L. curvatus* CRL705 obtenidos de diferentes fuentes (Tabla 10).

II.8.c.2 Caracterización de los adsorbatos por espectroscopía infrarroja

Cada adsorbato se caracterizó mediante espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (IRTF) utilizando un espectrómetro Thermo Nicolet 6700 equipado con un detector DTGS KBr y un accesorio de muestreo Smart iTR ATR. Se tomaron 64 barridos de cada muestra en un rango de 4000 a 650 cm^{-1} y con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros se tomaron utilizando el programa OMNIC (Nicolet).

Tabla 10. Adsorbatos utilizados y su origen

Adsorbato (contenido)	Origen	
	Microorganismo productor	Método de obtención
BC (lactocina 705, lactocina AL705 e impurezas)	<i>L. curvatus</i> CRL705	Obtenidos por precipitación con sulfato de amonio y posterior liofilización según descripción en Sección II.2.1
C-AL705 (lactocina AL705 e impurezas)	<i>L. curvatus</i> CRL1579	
C-Sac7 (impurezas)	Sac7	
S-705 (lactocina 705)	-	Lactocina 705 sintética se obtuvo según descripción en Sección II.2.5
P-AL705 (lactocina AL705 purificada e impurezas)*	<i>L. curvatus</i> CRL1579	C-AL705 purificada según descripción en Sección II.2.2

BC, bacteriocinas concentradas; C-AL705, lactocina AL705 concentrada; C-Sac7, Impurezas de la variante Bac-; S-705, lactocina 705 sintética; P-AL705, lactocina AL705 purificada. * P-AL705 tiene menor contenido de impurezas que C-AL705.

II.8.c.3 Adsorción de lactocina 705 a partir de la bacteriocina sintética (S-705).

Determinación de la CIM, cinética y equilibrio de adsorción de lactocina 705

Para la determinación de la CIM, se contactaron 260 µl de solución de S-705 (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 µg/ml) con 0.95 cm² de la película multicapa. Luego del contacto, las películas T60XXB se lavaron con agua destilada estéril y se determinó la actividad antimicrobiana en medio agar semisólido como se detalló anteriormente.

Para optimizar la temperatura y el tiempo de adsorción se contactó una solución de S-705 (1 µg/ml) con la película T60XXB (0.95 cm²) durante diferentes tiempos (entre 10 min y 2 h) a 20, 30 y 40°C. La isoterma de adsorción de la bacteriocina en la película se obtuvo contactando la misma con distintas concentraciones de S-705 a 30°C durante 1 h. En todos los casos se determinó el efecto de la temperatura y el tiempo en la actividad de lactocina 705 en ausencia de la película multicapa (solución control). La concentración de lactocina 705 en todos los ensayos se obtuvo a partir de las UB como se mencionó anteriormente (Sección II.4, Apéndice A). Para cada

combinación de tiempo/concentración/temperatura se determinó la cantidad de bacteriocina adsorbida en la superficie de PEBDL de la película T60XXB Γ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) mediante la ecuación [11]

$$\Gamma = \frac{(C_c - C_f)v}{A} \quad [11]$$

Donde C_c : concentración de lactocina 705 en la solución control, C_f : concentración luego del proceso de adsorción, v : volumen de solución de bacteriocina en contacto con una superficie A (cm^2) de la película multicapa (Sarkar y Chatteraj, 1993). Para todos los experimentos se confirmó la actividad antimicrobiana de la película en medio agar semisólido.

II.8.c.4 Adsorción de las bacteriocinas en diferentes condiciones

Con el objeto de evaluar la interacción entre las bacteriocinas y las impurezas (generadas por el crecimiento de las BL) durante el proceso de adsorción en la película multicapa, se llevó a cabo la combinación de los adsorbatos (Tabla 10) según lo indicado en la Tabla 11.

Tabla 11. Combinación de adsorbatos durante los experimentos de adsorción

Adsorbato I	Adsorbato II	Estudio	Cepa sensible
S-705 (desde 0,5 a $\mu\text{g}/\text{ml}$, correspondiente a 27 hasta 6400 UA/ml lactocina 705)	C-Sac7 (0.1%)	Adsorción de lactocin 705 Influencia de los metabolitos en la adsorción de 705	<i>L. plantarum</i> CRL691
	P-AL705 (2000 UA/ml AL705)	Influencia de lactocina AL705 en la adsorción de 705	
P-AL705* (desde 27 a 8717 UA/ml)	S-705 (6400 UA/ml 705)	Influencia de lactocina 705 en la adsorción de AL705	<i>L. innocua</i> 7
Lactocina AL705 de P-AL705* en comparación con lactocina AL705 de C-AL705 (desde 27 a 8717 UA/ml)		Influencia de los metabolitos en la adsorción de AL705	

*Lactocina AL705 purificada presenta menor contenido de metabolitos que C-AL705 para una solución del mismo título.

Se construyeron curvas de adsorción a partir de las áreas de inhibición relativas presentadas por las películas activas obtenidas *versus* el título de las bacteriocinas (UA/ml) luego del proceso de adsorción. Asimismo, para simular las condiciones de adsorción obtenidas en la activación con SABC 4% (lactocina 705, 6400 UA/ml; lactocina AL705, 12800 UA/ml), se contactó la película multicapa (1 h, 30°C) con una solución de S-705 (8 µg/ml, 6400 UA/ml) en presencia de C-Sac7 (0.01, 0.1, 2 y 4%) y P-AL705 (12800 UA/ml). Luego del contacto, se determinó la actividad antimicrobiana de las películas en agar semisólido. Se llevó a cabo el mismo experimento para estudiar la adsorción de lactocina AL705 a partir de P-AL705 (12800 UA/ml), C-AL705 (12800 UA/ml) y la combinación de P-AL705 con S-705 (lactocina AL705, 12800 UA/ml; lactocina 705, 6400 UA/ml).

Asimismo, se llevó a cabo un experimento de adsorción en forma secuencial contactando la película multicapa con S-705 (6400 UA/ml, 1 h, 30°C) en primer lugar y luego con C-Sac7 (4%, 1 h, 30°C); posteriormente la película se enjuagó y se determinó su actividad antimicrobiana en medio semisólido. El mismo experimento se repitió invirtiendo el orden de los adsorbatos.

II.9 Caracterización de las películas

II.9.a Película multicapa

II.9.a.1 Propiedades mecánicas

La tensión y el porcentaje de deformación a la rotura de la película T60XXB tratada con SABC y sin tratar, se ensayaron empleando una máquina de ensayos mecánicos (Instron modelo 1125, Instron, Norwood, MA, USA) según ASTM D638-07. La distancia entre las mordazas fue de 65 mm y la velocidad del ensayo de 500 mm/min.

II.9.a.2 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se determinó según la Norma ASTM E96-05. Las películas fueron acondicionadas durante 48 h a 50% humedad relativa (HR) y 23°C. Una vez acondicionadas, las películas (activa y sin activar) se colocaron sobre cápsulas de aluminio conteniendo sílica anhidra como agente desecante (área de intercambio de la película 0.048 m²), y se colocaron en una cámara de temperatura y humedad controladas. La permeabilidad al vapor de agua (mol/ Pa s m) se calculó mediante el incremento en el peso de la cápsula en función del tiempo, cuando el sistema alcanzó el estado estacionario, utilizando la siguiente ecuación [12]:

$$WVP = \Delta wx / A\Delta t\Delta p \text{ (mol H}_2\text{O/m s Pa)} \quad [12]$$

Donde Δw es el incremento de peso en la celda de permeabilidad en el estado estacionario (mol H₂O), x el espesor de la película (m); Δt el tiempo (seg) en el que se determina el incremento de peso; A , el área de la película (m²) y Δp , la presión de vapor diferencial (Pa) a través de la película. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

II.9.a.3 Determinación del ángulo de contacto y propiedades de sellado

El ángulo de contacto de la película activa y un control sin bacteriocinas se determinó mediante un goniómetro (Rame-Hart 500; Netcong, NJ, USA), en condiciones ambientales (23°C y 50% de HR) y utilizando agua como sustancia de contacto. Los experimentos se llevaron a cabo por quintuplicado. La fuerza de sellado de la película activa y control (termo-selladas a 150°C, 1 seg, 2.5 Pa, con una máquina TP-701S Heat Seal Tester, Tokyo, Japan) se comparó según la norma ASTM F88-09, utilizando una máquina Instron (modelo 1125, Instron, Norwood, MA, USA) a 23°C y 50% HR. La velocidad de separación de mordazas fue de 200 mm/minutos, con una distancia inicial de 25 mm. El experimento se llevó a cabo utilizando 7 replicados.

II.9.a.4 Ensayo de migración total

La determinación de la migración total en simulante acuoso (A) a 40°C durante 10 días, se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la norma BS EN 1186-7 "Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics. Part 7" y la Resolución Mercosur GMC N°32/10.

II.9.a.5 Estabilidad antimicrobiana de la película activa

Se evaluó la influencia de la temperatura y el tiempo en la actividad antimicrobiana de la película luego de 7, 14, 32 y 45 días de almacenamiento a 30, 10 y 5°C. La actividad antimicrobiana se expresó como porcentaje de inhibición respecto a la actividad de la película al inicio del experimento.

II.9.a.6 Evaluación de la actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película activa luego del contacto con agua y aceite de girasol

La película activa (0.95cm²) se puso en contacto con agua y aceite de girasol (260µl a 5°C) representando medio hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente. Luego de 10 días de contacto, las películas activas se removieron y se evaluó su actividad antimicrobiana en agar semisólido (Sección II.7). Como control positivo de bacteriocinas se utilizó una película activa almacenada 10 días a 5°C. La actividad antimicrobiana en el agua y aceite luego de remover las películas, se determinó mediante el método de difusión en agar. Con el objeto de determinar la influencia de los medios (hidrofóbico e hidrofílico) en la actividad de las bacteriocinas, el liofilizado conteniendo BC, 67 UA/ml de lactocina 705 y 533 UA/ml de lactocina AL705 se re-suspendió en cada medio, se almacenó 10 días a 5°C y se evaluó su actividad antimicrobiana cada 2 días. Todos los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

II.9.b Película de gluten

II.9.b.1 Acondicionamiento de las muestras

A los efectos de su caracterización, las películas de gluten obtenidas (activa y control sin bacteriocinas) fueron acondicionadas en un desecador con humedad relativa controlada (50%) y una temperatura de 23°C durante 48 h. El control de humedad se realizó mediante una solución saturada de nitrato de magnesio hexahidratado p.a. (Anedra).

II.9.b.2 Propiedades mecánicas y porcentaje de humedad

La tensión y el porcentaje de deformación a la rotura de las películas de gluten conteniendo lactocina 705 y AL705 y un control sin bacteriocinas se determinaron mediante una máquina Instron, según ASTM D638-07. La distancia entre las mordazas fue de 65 mm y la velocidad del ensayo de 50 mm/min. El porcentaje de humedad de las películas se determinó por diferencia de peso entre la película antes y después de ser desecado en estufa a 100°C durante 2 h.

II.9.b.3 Estudio de las propiedades de las películas de gluten en función del tiempo de almacenamiento

Las películas de gluten (activa y control) se almacenaron 50 días a 23°C y se tomaron muestras periódicamente con el objeto de determinar las propiedades que se mencionan a continuación en función del tiempo de envejecimiento.

Propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua. Se determinaron periódicamente las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de en función del tiempo según lo anteriormente descrito (ver Sección II.9.a 1 y 2). Las condiciones de humedad para el estudio de permeabilidad fueron de 75% HR, 23°C y un área de intercambio en las cápsulas de permeabilidad de 0.00181 m²

Estabilidad antimicrobiana de la película activa. Se determinó la actividad antimicrobiana de la película de gluten (Sección II.7) en función del tiempo en medio agar semisólido.

Actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película de gluten luego del contacto con agua y aceite de girasol. Se determinó la actividad residual en la película y en los medios (hidrofóbico e hidrofílico) en función del tiempo según lo detallado en la Sección II.9.1.f.

II.10 Determinación de la eficiencia antimicrobiana de los materiales activos en un modelo alimentario (salchichas de Viena) a escala piloto.

II.10.a Elaboración de salchichas tipo Viena

Las salchichas tipo Viena cocidas fueron provistas por la planta piloto de producción de embutidos de INTI-Carnes. La elaboración se llevó a cabo a partir de los ingredientes detallados en la Tabla 12.

Tabla 12 Ingredientes utilizados en la elaboración de salchichas

Materias primas/ingredientes	Base porcentual (%)
Carne Vacuna (recorte 80/20)	50
Grasa de cerdo (trimming 20/80)	23
Agua/ hielo	22
Almidón de mandioca	3
Fosfato	0.3
Eritorbato de sodio	0.05
Sal fina	1.7
Nitrito de sodio	0.015

Se siguieron los pasos descriptos en el diagrama de elaboración (Fig. 5). Los recortes vacunos junto con la grasa de cerdo fueron picados usando un disco de 5 mm (Picadora Themis 32). La mezcla de carne y grasa se colocó en una cutter de eje vertical (Robot Coupe), se agregaron las sales disueltas en agua y la mitad de agua de la fórmula en forma de hielo, se mezcló hasta la obtención de una masa homogénea. Luego se adicionó el almidón y el resto del agua, mezclando hasta su completa integración. El pastón obtenido se embutió en tripa celulósica calibre 20 mm (Embutidora hidráulica, RISCO IV 20) y se ataron los extremos con hilo de manera de obtener salchichas de 5 cm de largo. La cocción del producto se llevó a cabo en un horno (Horno cocina ahumadero, Lavaflux) a 80°C

durante 15 min. Finalizada esta operación se procedió al enfriado de las salchichas en bateas con agua fría, hasta que la temperatura del centro del producto haya descendido por debajo de 40°C y se refrigeraron a 3°C hasta su pelado en forma manual. Una vez que se retiró la tripa, las salchichas se envasaron (Envasadora de vacío Roshermatic, 99% vacío) y re-pasteurizaron durante 10 min a 80°C.

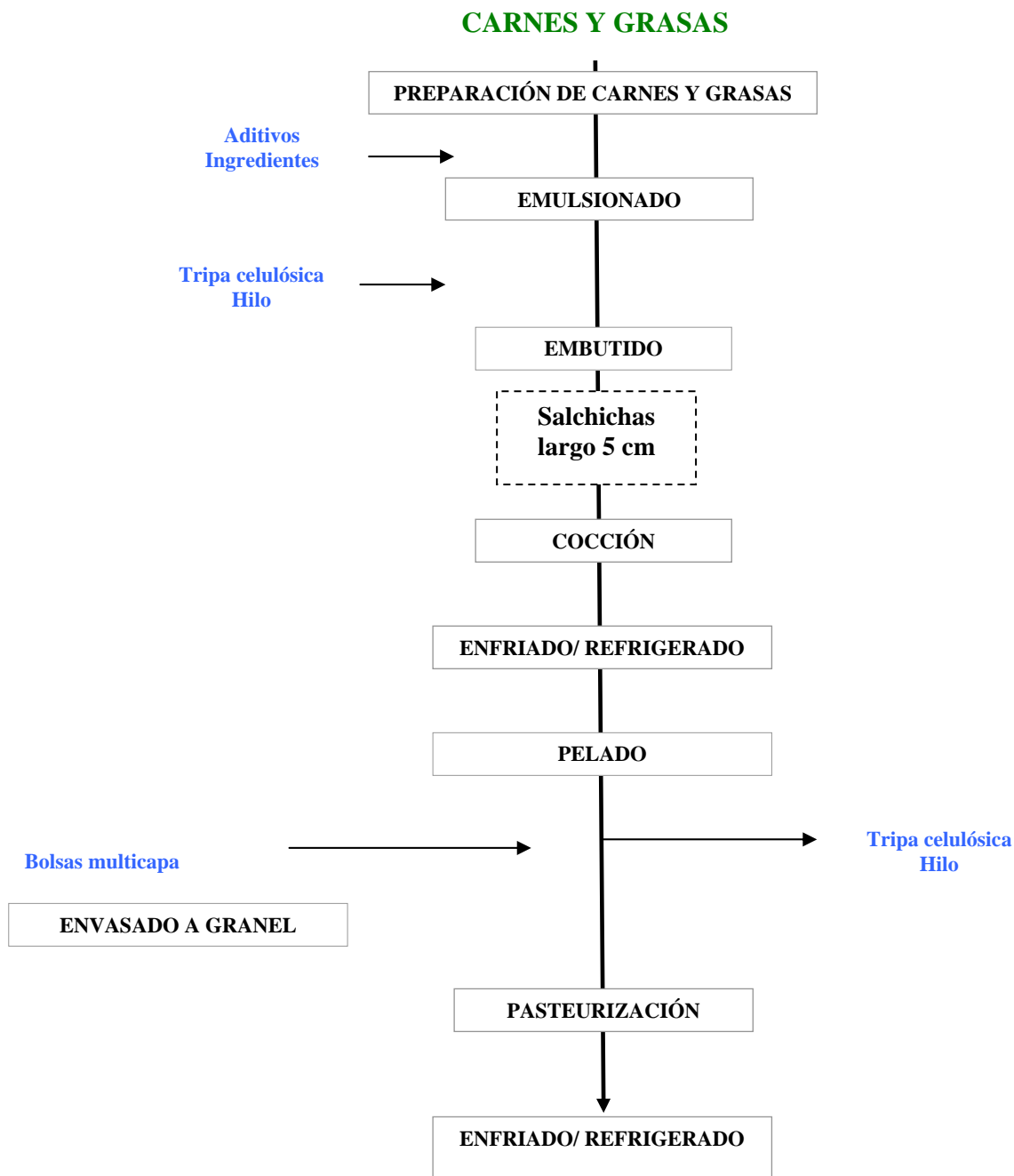


Figura 5. Diagrama de elaboración de salchichas tipo Viena

II.10.b Obtención envases activos

II.10.b.1 A partir de películas multicapa

Las películas T60XXB y T73XXB (158 cm²) se pusieron en contacto (1 h a 30°C) con la SABC (37 ml). Luego de la activación, las películas se dejaron secar a temperatura ambiente y se expusieron a la luz UV durante 10 minutos para eliminar posibles contaminaciones superficiales. Se tomaron muestras de las mismas para evaluar su actividad antimicrobiana y compararla con la obtenida en películas producidas por el método de contacto por flotación (Sección II.8.a.1). Cada par de películas (T60XXB y T73XXB) se termo-selló en una cabina de flujo laminar (Biosafety cabinet Labcono, purifier class II) para obtener el envase en condiciones de esterilidad. Hasta su uso, los envases obtenidos se almacenaron a 5°C en bolsas cerradas. Se llevaron a cabo controles negativos utilizando agua en lugar de la SABC.

II.10.b.2 A partir de la película de gluten

Las películas T60XXB y T73XXB sin activar se termo-sellaron en las condiciones descritas anteriormente para formar un envase en el que se incluyó una almohadilla de gluten conteniendo las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 obtenida según lo detallado en la Sección II.8.b. Se llevaron a cabo controles negativos utilizando agua en lugar de la SABC.

II.10.c Inoculación de las salchichas

Las salchichas re-pasteurizadas se inocularon por separado con *L. innocua* 7 (10⁴ UFC/g) y *L. plantarum* CRL691 (10⁴ UFC/g) en la cabina de flujo laminar. Luego de la inoculación, las salchichas fueron colocadas en los envases activos obtenidos y en envases controles sin activar. Paralelamente se incluyeron controles de salchichas re-pasteurizadas sin inocular que se colocaron en envases sin bacteriocinas. Los paquetes obtenidos se termo-sellaron con un 90% de vacío

utilizando una envasadora de vacío externo (Erlich Best Vacuum) y se almacenaron a 5°C durante 45 días.

II.10.d Análisis microbiológico y determinación de la actividad antimicrobiana residual

Inmediatamente después de la inoculación y luego de 4, 13, 19, 29, 34 y 45 días, los paquetes se abrieron asépticamente y se realizaron recuentos de microorganismos. Porciones de las salchichas se mezclaron (1:10) con solución fisiológica (NaCl 0,85%) como medio de dilución y se homogenizaron en Stomacher (Seward Laboratory Blender, Stomacher 400) durante 2 min. Los recuentos de *L. innocua* 7 y *L. plantarum* CRL691 se realizaron a partir del plaqueo de diluciones decimales seriadas utilizando solución fisiológica en medio MOX adicionado con moxalactama de sodio y MRS en condiciones anaeróbicas, respectivamente. En los paquetes sin inóculo se realizaron recuentos de mesófilos totales (Plate Count Agar). Todos los medios se incubaron 48 h a 35°C. Se utilizó el programa DMFit manual Version 2.0. (Baranyi y Roberts, 1994) para modelar el crecimiento de los diferentes microorganismos inoculados.

Se determinó la actividad antimicrobiana residual del exudado y las películas en medio agar semisólido sembrado con las cepas sensibles (ver Sección II.4 y II.7, respectivamente). La actividad en las películas T60XXB en contacto con las salchichas se comparó con la correspondiente a los bordes del mismo paquete que no estuvieron en contacto con el alimento.

II.10.e Análisis visual y determinación del pH

En cada tiempo evaluado se determinó pH y se realizó inspección visual de todos los paquetes.

II.11 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el test de Tukey con un nivel de significancia del 95%. Para seleccionar la solución de activación. (Sección II.8.1.b) se llevó a cabo un diseño factorial 2³, cuyos factores fueron (i) tipo de solución (2 niveles,

isopropanólica y acuosa); (ii) concentración (2 niveles; 0.1 y 1%) y (iii) tiempo (5 niveles: 1, 2, 5, 12 y 24 h). El desarrollo experimental se realizó completamente al azar y fue llevado a cabo por duplicado. Para evaluar la eficiencia antimicrobiana de los materiales antimicrobianos en las salchichas se llevaron a cabo tres experimentos independientes por duplicado. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa Minitab Statistic release 12 (Pennsylvania, USA).

CAPÍTULO III

OBTENCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

**PRODUCIDAS POR *L. CURVATUS* CRL705 PARA SU
INCORPORACIÓN EN MATERIALES POLIMÉRICOS**

III.1 Introducción

Las bacteriocinas producidas por BL son pequeños péptidos catiónicos (entre 10 y 50 aminoácidos), con una sustancial presencia de residuos hidrofóbicos ($\geq 30\%$), que difieren ampliamente en algunas características como peso molecular, presencia de grupos de aa específicos, pI, carga neta positiva y en las modificaciones post-traduccionales de ciertos aa, dando lugar a una gran heterogeneidad. En los últimos 25-30 años numerosos estudios se han enfocado en las bacteriocinas producidas por BL debido a su potencial aplicación biotecnológica. La producción de estas sustancias inhibitorias está estrechamente ligada al crecimiento del organismo bacteriocinogénico; su biosíntesis en general ocurre durante la fase exponencial de crecimiento, cesando su producción cuando las células entran en la fase estacionaria, como fue determinado para diferentes BL y en particular para *L. curvatus* CRL705 (Vignolo y col., 1993, 1995). Existen dos estrategias para la aplicación de bacteriocinas como bioconservantes: (i) producción *in situ* mediante la inoculación de una BL bacteriocinogénica y (ii) la producción *ex situ* que incluye la adición directa de bacteriocinas ya sea sintéticas, purificadas o semi-purificadas a partir de sobrenadantes de cultivo de cepas productoras. Estas aplicaciones estarían en gran medida facilitadas con el desarrollo de procedimientos eficientes de detección, cuantificación y purificación (Martínez y col., 2000).

Debido a la gran heterogeneidad en las características estructurales y funcionales de las bacteriocinas, no existe un procedimiento general para su purificación. A pesar de ello, se han publicado numerosas estrategias para la purificación analítica a homogeneidad de bacteriocinas producidas por BL (Saavedra y Sesma, 2011). Para la producción *ex situ*, las bacteriocinas originadas durante el crecimiento bacteriano son secretadas al medio de cultivo. Dado el bajo rendimiento de producción de estos péptidos, es necesaria una concentración preliminar del sobrenadante libre de células, siendo ésta llevada a cabo mediante etapas secuenciales de

precipitación con sulfato de amonio. Aunque la mayoría de las bacteriocinas exhiben reducida actividad a elevadas concentraciones salinas, el sulfato de amonio (80%) no interfiere con la actividad antimicrobiana. La etapa de concentración de bacteriocinas también puede ser realizada por evaporación bajo vacío y extracción con solventes orgánicos como acetona, etanol o cloroformo (Burianek y Yousef, 2000; Taylor y col., 2007). Por otra parte y debido a las exigencias nutricionales de las BL, para su crecimiento se requieren medios ricos y complejos que a menudo contienen cantidades considerables de pequeños péptidos (3.000-6.000 Da) en el rango de la concentración de bacteriocinas (Parente y Ricciardi, 1999). Las alternativas para superar este inconveniente incluyen el uso de medios de cultivo que permitan la máxima producción de antimicrobiano con la mínima interferencia con el esquema de purificación. Aunque algunos estudios demostraron que el Tween 80 interfiere con la producción y purificación de las bacteriocinas (Kawai y col., 1994), la evaluación de la influencia del medio de cultivo y de los nutrientes presentes sobre la producción de lactocina 705 por *L. curvatus* CRL705, mostró que el medio MRS era el más efectivo obteniéndose la mayor actividad inhibitoria en presencia de Tween 80 y ausencia de peptona (Vignolo y col., 1995).

Entre los procedimientos para la semi-purificación de bacteriocinas, Yang y col. (1992) describieron una metodología basada en el rango de pH específico (entre 5 y 7) en el cual estos compuestos se adsorben a la superficie celular y luego se desorben al disminuir el pH en presencia de DSS (dodecil sulfato de sodio). De esta forma se obtienen bacteriocinas libres de sustancias proteinaceas contaminantes. También se han diseñado otras técnicas de semi-purificación basadas en adsorción/desorción usando diferentes adsorbatos como ácido silícico, ceniza de cáscara de arroz, diatomitas-silicato de calcio así como diferentes resinas para la purificación de pediocinas, leucocinas, sakacina A, piscicolina 126, lactocina G13, enterocina CS1 así como varios lantibióticos incluida nisina (Coventry y col., 1996; Janes y col., 1998; McAuliffe y col., 1998; Zendo y col., 2006; Aso y col., 2008). No obstante, esta metodología resultó inapropiada y con

bajo rendimiento para la purificación en gran escala en el caso de bacteriocinas de dos componentes (Nissen-Meyer y col., 1992; Anderssen y col., 1998).

Para lograr un alto grado de pureza se requiere la aplicación de cromatografía. La naturaleza catiónica e hidrofóbica de las bacteriocinas permite utilizar columnas de intercambio catiónico (SP-Sefarosa o CM-Sefadex), con las cuales la liberación de péptidos se obtiene mediante un gradiente lineal de NaCl, siendo finalmente reunidas y concentradas por cromatografía de fase reversa (RP-HPLC) (Saavedra y Sesma, 2011), etapa en que se utilizan soportes poliméricos unidos a cadenas hidrocarbonadas lineales entre C₄ y C₈ (matrices hidrofóbicas). En esta última etapa las bacteriocinas son eluidas mediante un gradiente de agua-solventes orgánicos como metanol, isopropanol o acetonitrilo (Palacios y col., 1999; Saavedra y col., 2004; Saavedra y Sesma, 2011). A pesar de ser el más usado, este protocolo es laborioso, insume mucho tiempo y generalmente la recuperación de péptidos es baja, resultando inadecuado para purificaciones en gran escala requeridas en aplicaciones biotecnológicas. Como consecuencia de esto, se han llevado a cabo modificaciones en los procedimientos de purificación usando lechos de adsorción expandidos (Callewaert y De Vuyst, 1999) o supresión de la precipitación con sulfato de amonio, sometiendo el sobrenadante de cultivo directamente a cromatografía de intercambio catiónico y elución de la fracción activa con propanol (Guyonnet y col., 2000; Uteng y col., 2002). Además de los esquemas anteriores, recientemente se ensayó la purificación en una etapa mediante cromatografía de inmunoafinidad, usando anticuerpos monoclonales específicos para cada bacteriocina (Saavedra y Sesma, 2011).

Otro aspecto importante en la aplicación de bacteriocinas como bioconservantes es su cuantificación. Para el monitoreo de la velocidad y cantidad de bacteriocina producida durante el crecimiento en un determinado medio de cultivo, es necesario contar con un método de cuantificación preciso y exacto. Existen varias técnicas, siendo las más usadas las diluciones seriadas en tubos, ensayos de turbidez, bioensayos de difusión en agar, fotometría,

quimioluminiscencia y ELISA. Si bien por definición las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular, las variaciones en su masa y estructura influyen la difusión en el medio agarizado como en el caso de nisina, que presenta mayor tamaño molecular que los antibióticos y otras bacteriocinas. Otro parámetro de influencia significativa en la determinación de la actividad de bacteriocinas es la elección del organismo indicador o sensible. En estudios previos, *L. plantarum* CRL691 así como *L. innocua* 7 resultaron los organismos más sensibles para la cuantificación de la capacidad inhibitoria de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 (Vignolo y col., 1993; Castellano y col., 2004). En este capítulo se describe la obtención de bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 para ser incluidas en materiales poliméricos de empaque. Para tal fin se emplearon diferentes métodos de purificación con el objetivo de obtener la máxima actividad de lactocina 705 y lactocina AL705 en el menor tiempo posible. Asimismo, se presenta la optimización de condiciones para mejorar la precisión y exactitud en la cuantificación de las bacteriocinas.

III.2 Resultados y Discusión

III.2.a Purificación de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705

Lactocina 705 y lactocina AL705 fueron parcialmente purificadas utilizando diferentes métodos y se comparó la actividad antimicrobiana de las soluciones obtenidas en cada caso (Tabla 13). Cuando se ensayaron frente a los organismos indicadores, las soluciones de bacteriocinas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio (SABC) y extracción con isopropanol (SIBPP) permitieron obtener una actividad inhibitoria mayor que la solución obtenida luego de la extracción en fase sólida (SSPE). Asimismo, la actividad antimicrobiana de SABC resultó ser mayor que la de SIBPP (Tabla 13). Por otra parte y teniendo en cuenta las actividades específicas de las soluciones obtenidas mediante los diferentes protocolos de purificación, se observaron

mayores valores para la extracción en fase sólida (SSPE) y en segundo lugar para la precipitación con sulfato de amonio y posterior liofilización, exhibiendo la extracción con isopropanol los menores valores de actividad específica. Estos resultados sugieren un mayor grado de pureza de las bacteriocinas obtenidas mediante la extracción en fase sólida en comparación con los otros dos métodos ensayados. Resultados similares fueron reportados en la purificación de salivaricina CRL1328 (bacteriocina de la clase IIb), donde se obtuvieron menores valores de actividad específica luego de la precipitación con sulfato de amonio, respecto a la extracción en fase sólida (Vera Pingitore y col. 2007). No obstante, las sucesivas diluciones producidas durante la extracción en fase sólida usada en la purificación serían responsables de la disminución en la actividad antimicrobiana observada. En este trabajo, la extracción con isopropanol y la precipitación con sulfato de amonio y posterior liofilización, además de presentar mayores actividades antimicrobianas, resultaron métodos más rápidos y sencillos como lo evidencian los respectivos tiempos de proceso (Tabla 13). La extracción líquido-líquido con solventes orgánicos para la purificación de bacteriocinas ha sido aplicada por Bizani y col. (2005) quienes observaron un alto grado de purificación del péptido antimicrobiano cereina 8A luego de la precipitación con sulfato de amonio y extracción con 1-butanol. Por otra parte y con el objeto de ser usados en la obtención de películas con actividad biológica, los lantibióticos lacticina 3147 y nisina producidos por cepas de *Lactococcus lactis*, fueron obtenidos por secado spray previa evaporación hasta 40% de sólidos y por deshidratación del sobrenadante de un cultivo parcialmente purificado, respectivamente (Morgan y col., 2001; Thomas y col., 2000).

En vista de la inclusión de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 en películas para envasar alimentos y si bien el isopropanol resulta nocivo en caso de ingestión o inhalación; durante el proceso de obtención de la película antimicrobiana (Sección II.8.a.1) existe una etapa de lavado con agua y posterior secado (50°C durante 10 min), asegurando así la total eliminación de isopropanol. No obstante, este compuesto así como todas las sustancias usadas en

esta Tesis para la purificación de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 se encuentran incluidos en la lista positiva de aditivos para materiales plásticos destinados a la elaboración de envases en contacto con alimentos, sin límite de restricción (Resolución Mercosur/GMC/Res. N° 32/07). En consecuencia, las soluciones parcialmente purificadas obtenidas en este Capítulo podrían ser posteriormente usadas en la biopreservación de alimentos.

Tabla 13. Actividades antimicrobianas exhibidas por lactocina 705 y AL705 luego de su purificación mediante diferentes métodos.

Método de purificación	Solución obtenida	Tiempo (hs)	Actividad (UA/ml)		Actividad específica (UA/μg)	
			lactocina 705	lactocina AL705	lactocina 705	lactocina AL705
Precipitación con sulfato de amonio	SABC	13	4267	8533	2.49	4.98
Extracción con isopropanol	SIBPP	16	2133	2133	1.88	1.93
Extracción en fase sólida	SSPE	20	533	1067	5.74	11.49

III.2.b Cuantificación de la actividad antimicrobiana. Determinación del tiempo de difusión a 4°C

A los efectos de optimizar la efectividad antimicrobiana de las soluciones de bacteriocina obtenidas, y mejorar la precisión y exactitud de las determinaciones de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, se evaluó el efecto de un tratamiento de predifusión a 4°C durante diferentes tiempos. Para ambas bacteriocinas, el radio del halo de inhibición guardó una correlación lineal con el \log_{10} del título de bacteriocinas, obteniéndose un significativo incremento en la pendiente de la recta de regresión para 24 h de pre-difusión a 4°C (Tabla 14). Un aumento en la pendiente representaría un mayor cambio en el tamaño del halo de inhibición para una misma

concentración de bacteriocina, impactando directamente en un aumento en la exactitud del ensayo (Wolf y Gibbons, 1996).

Tabla 14. Efecto del tiempo de predifusión sobre la pendiente de las ecuaciones de regresión (radio de inhibición *versus* Log₁₀ título de bacteriocinas)

Bacteriocina	Control sin predifusión	Tiempo de predifusión (h)				
		2	4	6	8	24
lactocina 705	3,2±0,2 ^a	2,8±0,2 ^a	3,0±0,2 ^a	3,0±0,2 ^a	3,4±0,1 ^b	4,1±0,3 ^c
lactocina AL705	2,6±0,1 ^a	2,8±0,3 ^b	3,1±0,3 ^b	2,9±0,3 ^b	2,9±0,2 ^b	3,9±0,3 ^c

^{a-c} Valores seguidos de letras distintas en una misma fila son significativamente diferentes (P<0,05)

Para evaluar el efecto del almacenamiento a 4°C durante 24 h sobre el crecimiento del césped del organismo indicador y en consecuencia el aumento en los halos de inhibición, se realizaron tres ensayos diferentes para la de determinación del título, comparando las pendientes de las rectas obtenidas (Tabla 15). Los ensayos difirieron entre sí en la etapa de difusión a 4°C durante 24h (Sección II.3).

Tabla 15. Efecto de los diferentes ensayos de inhibición sobre las pendientes de las ecuaciones de regresión (radio de inhibición *versus* log₁₀ título de bacteriocinas)

Bacteriocina	Ensayo 1*	Ensayo 2*	Ensayo 3*
lactocina 705	3,2±0,2 ^a	4,1±0,3 ^b	2,4± 0,1 ^c
lactocina AL705	2,9±0,1 ^a	3,9±0,3 ^b	2,2± 0,1 ^c

^{a-c} Valores seguidos de letras distintas en una misma fila son significativamente diferentes (P<0.05)

*Ensayo 1, método de difusión en agar convencional; Ensayo 2, método de difusión en agar con una etapa de incubación a 4°C posterior a la inoculación de las soluciones activas a titular; Ensayo 3, método de difusión en agar con una etapa de incubación a 4°C anterior a la inoculación de las soluciones activas a titular, (para más detalles ver Sección II.3)

Para ambas bacteriocinas los resultados mostraron una disminución en el valor de las pendientes cuando las placas de Petri sembradas se almacenaron durante 24 h a 4°C antes de

inocular las soluciones activas a titular (Ensayo 3), indicando una disminución en la exactitud del método. Sin embargo, cuando se compararon el valor de las pendientes de los ensayos con difusión a 4°C (Ensayo 2) y sin difusión a 4°C (Ensayo 1) se observó un claro aumento de las mismas en presencia del tratamiento de predifusión a 4°C, confiriendo mayor exactitud al experimento. Asimismo, la disminución de los halos de inhibición obtenidos en el Ensayo 3 confirmaría la hipótesis de que el aumento de los radios de inhibición se debería a la predifusión durante 24 h y no a una disminución del crecimiento de la cepa indicadora. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pongtharangkul y Demirci (2004) quienes encontraron un aumento en la pendiente de las ecuaciones de regresión como consecuencia de la predifusión a 4°C durante la titulación de nisina utilizando *Micrococcus luteus*, *L. sakei* y *Brochothrix thermosphacta* como microorganismos indicadores. Según estos mismos autores, para lograr precisión en la determinación de actividad antimicrobiana, la curva standard de calibración debería tener un coeficiente de correlación de por lo menos 0,98. En este trabajo, si bien se obtuvo una leve disminución en los coeficientes de correlación de las rectas obtenidas con el tratamiento de predifusión (Ensayo 2), éstos fueron superiores a 0.98 (Fig. 6ayb).

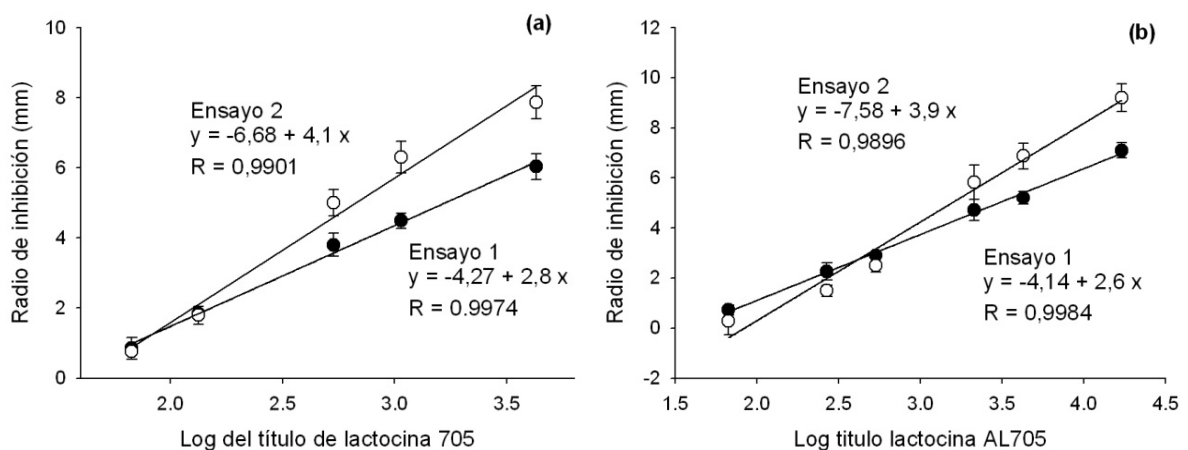


Figura 6. Radios de inhibición *versus* log₁₀ del título de (a) lactocina 705 y (b) AL705, ensayados con (○) y sin (●) tratamiento de predifusión (24 h a 4°C)

III.3 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las soluciones de bacteriocinas SABC y SIBPP como fuente de lactocina 705 y AL705 para ser incluidas en películas para envasar alimentos. Las soluciones conteniendo las bacteriocinas mostraron una elevada actividad antimicrobiana y el tiempo requerido para su obtención fue menor. Asimismo, debido a la mayor exactitud obtenida en el método de difusión en agar mediante el tratamiento de predifusión (4 °C, 24 h), se decidió aplicar dicho tratamiento para la titulación de las bacteriocinas.

CAPÍTULO IV

**OBTENCIÓN DE PELÍCULAS ACTIVADAS CON LAS
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *L. CURVATUS***

CRL705

IV.1 Introducción

En los últimos años se ha reconocido de manera creciente que la innovación en envases produce un impacto positivo en la rentabilidad del producto final. Si bien las nuevas tecnologías de envases pueden generar un aumento en el precio respecto al uso de envases pasivos, se generan a su vez mayores beneficios agregando valor al producto alimenticio, aumentando su calidad, reduciendo el daño, y mejorando la eficiencia en la producción y distribución del alimento (Twede, 2009). La elección de materiales poliméricos activos en la industria alimenticia tiene por objeto mejorar la aptitud de los materiales de empaque convencionales para la óptima distribución de los alimentos a los consumidores. La decisión de utilizar alguna forma de empaque activo está basada generalmente en una de las siguientes consideraciones (Scully, 2009):

1. Extensión de la vida útil del alimento.
2. Elección del material activo menos costoso.
3. Método de procesamiento más simple.
4. Reducción o remoción de agentes preservantes en la formulación del alimento.
5. Mejora en el manejo de productos delicados, susceptibles de contaminación.
6. Acceso a materiales para productos con vida útil de varios años (por Ej. plásticos esterilizables).
7. Presentación final del producto más útil para el consumidor.

Para la obtención de películas con actividad antimicrobiana, el agente activo puede ser incorporado como una cubierta (coating), integrado dentro del polímero, inmovilizado o adsorbido en la superficie del material de empaque de acuerdo a las características de los agentes antimicrobianos y el mecanismo por el cual presentan su actividad. Los procesos térmicos como la extrusión o inyección se utilizan para agentes antimicrobianos resistentes a elevadas temperaturas como plata y zeolitas sustituidas. Mientras que en el caso de agentes sensibles a la temperatura como enzimas y componentes volátiles, se utilizan métodos en los cuales las condiciones de procesamiento son más suaves. Si bien las bacteriocinas son péptidos que presentan relativa

resistencia al calor, su actividad antimicrobiana es mayor cuando no se usan procesos de calentamiento (Appendini y Hotchkiss, 2002). Por este motivo, en general la activación de polímeros sintéticos o biodegradables con bacteriocinas se lleva a cabo mediante *casting* (Marcos y col., 2013), *coating* (Grower y col., 2004b; Mauriello y col., 2004; Ho Lee y col., 2004) o aprovechando la capacidad de adsorción de bacteriocinas en diversas superficies, utilizando en todos los casos temperaturas de procesamiento que no superan los 70°C (Bower y col., 2001, 2002; Ryder y col., 2010; Ibarguren y col., 2010b). Asimismo, junto al esfuerzo por encontrar agentes antimicrobianos más seguros, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para el desarrollo de matrices bio-poliméricas como soportes para agentes microbianos naturales (Cho y col., 2009). Para la producción de biopolímeros, uno de los métodos más utilizados es la evaporación del solvente usado en la solución filmogénica. Este proceso se basa en la creación y estabilización de una estructura continua a través de interacciones intermoleculares químicas y físicas. Los polisacáridos, proteínas y lípidos son buenos candidatos para ser enriquecidos con agentes antimicrobianos, por su solubilidad en agua, etanol y otros solventes compatibles con agentes antimicrobianos (Kraśniewska y Małgorzata, 2012). El uso de biopolímeros para la obtención de materiales con propiedades antimicrobianas frente a patógenos y contaminantes comúnmente presentes en alimentos ha sido ampliamente revisado en la bibliografía (Cha y Chinnan, 2004; Coma y col., 2008; Kraśniewska y Małgorzata, 2012). En el presente Capítulo se describe la obtención de películas activadas con nisina y las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705. La activación se llevó a cabo en (i) una película multicapa comercial (Sección IV.1) y (ii) una película obtenida a partir de un recurso renovable (Sección IV.2).

IV.2 Resultados y Discusión

IV.2.a. Película multicapa antimicrobiana

IV.2.a.1 Selección del método de activación

Se ensayó preliminarmente el método de contacto en bolsas preparadas con las películas T60XXB y T73XXB, ambas con cara interna de polietileno de baja densidad lineal (PEBDL), para su activación con SABC conteniendo lactocina 705 y AL705. Los resultados mostraron valores similares de actividad antimicrobiana para ambas películas frente a las cepas sensibles (Fig. 7a). Sin embargo, la presencia de una capa de PP y mayor espesor en la película T60XXB respecto a la película T73XXB (Sección II.5.a; Fig.4, Tabla 7) le otorgaron mayor rigidez a la primera. Estas características hicieron que la película T60XXB resulte ser más fácil de manipular, por lo tanto esta película se utilizó en los ensayos sucesivos. Para la obtención de la película activada con las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705, se ensayaron tres métodos de activación: contacto en bolsa, inmersión y contacto (por flotación). Los resultados mostraron mayor efectividad de activación cuando se usó el método de inmersión en la solución SABC comparado con el método de contacto en bolsa, exhibiendo mayores áreas de inhibición y una distribución más uniforme de las bacteriocinas lactocina 705 y lactocina AL705 en la superficie de la película (Fig. 7b). Por otro lado, la comparación de las áreas de inhibición relativas de las películas activadas por inmersión y contacto (por flotación) no mostró diferencias significativas entre ellas (Fig. 8). Los resultados obtenidos con los tres métodos ensayados para la incorporación de bacteriocinas en la superficie de películas multicapa demostraron que la inmersión y el contacto (por flotación) resultaron más efectivos que la activación por contacto en bolsas. En los dos primeros métodos se obtuvieron áreas de inhibición más uniformes en la superficie de la película sugiriendo que las bacteriocinas se encontrarían más uniformemente unidas difundiendo regularmente en el agar.

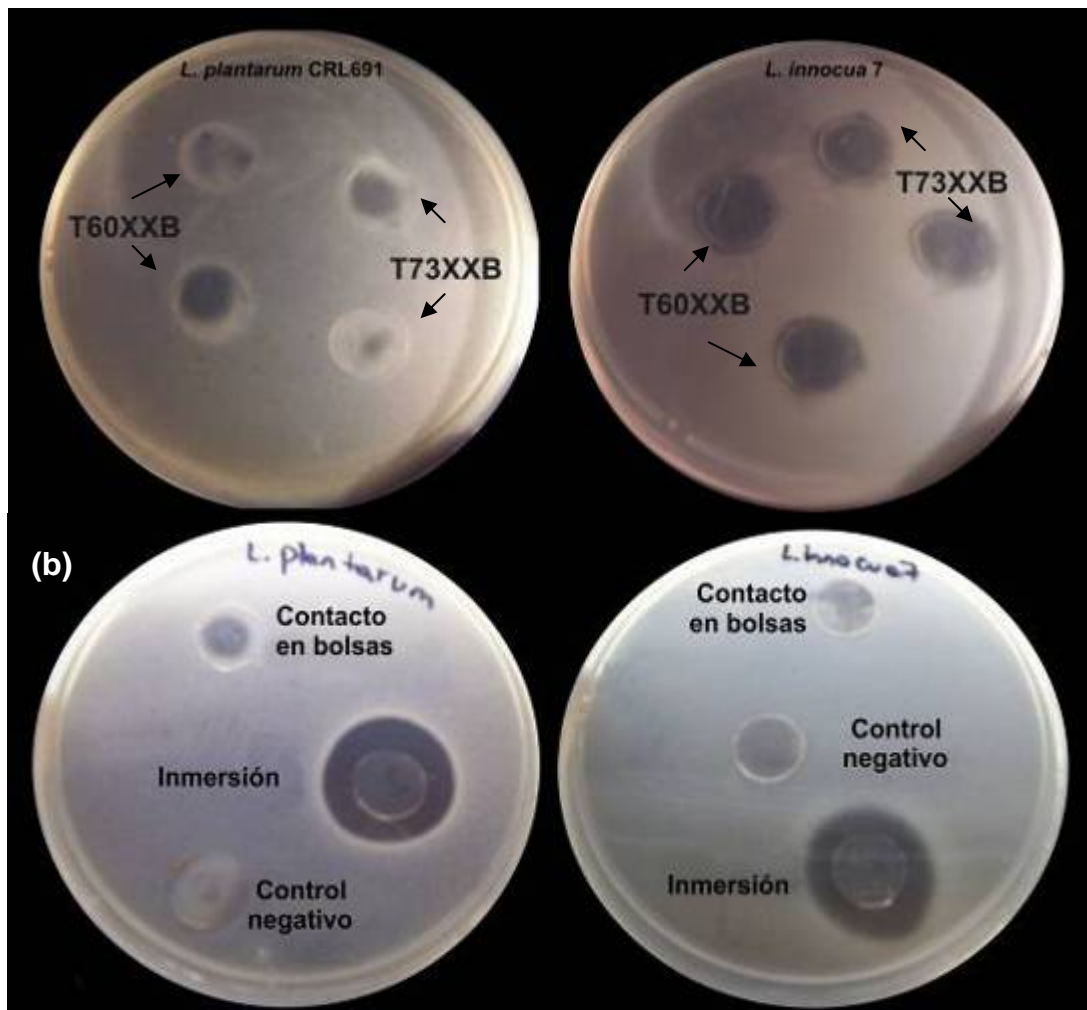


Figura 7. Actividad antimicrobiana de lactocina 705 (frente a *L. plantarum* CRL691) y lactocina AL705 (frente a *L. innocua* 7) en (a) películas T60XXB y T73XXB activadas por contacto en bolsas y (b) película T60XXB activada por contacto en bolsas e inmersión en SABC y control negativo

Mauriello y col. (2004) obtuvieron películas activas de polietileno-poliamida orientada (PE-OPA) conteniendo la bacteriocina anti-listeria producida por *L. curvatus* 32Y por inmersión en la solución activa, sin embargo observaron una difusión irregular de dicha bacteriocina desde la película. La etapa de lavado luego de la activación, llevada a cabo en el presente estudio, podría ser la responsable de la difusión uniforme de lactocina 705 y AL705 en el agar, ya que la actividad antimicrobiana observada se debería a las bacteriocinas fuertemente adsorbidas en la superficie.

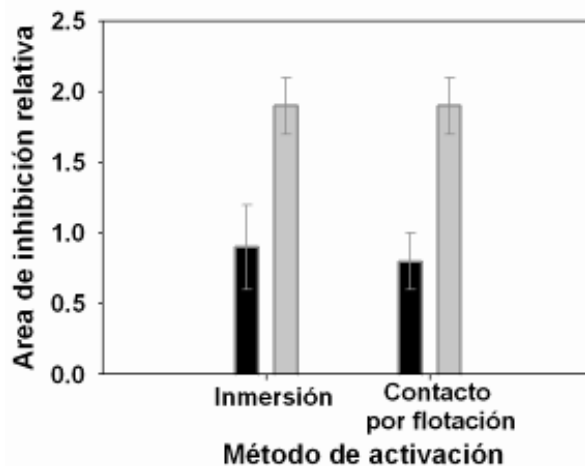


Figura 8. Área de inhibición relativa de (■) lactocina 705 y (■) lactocina AL705 en las películas obtenidas por inmersión y contacto por flotación

El método de contacto para la activación de diversos materiales con bacteriocinas también fue reportado en la bibliografía. En efecto, la adsorción de nisina en superficies hidrofóbicas e hidrofílicas de silicona y en materiales de celofán utilizando el método de contacto demostró ser efectiva en el control del crecimiento microbiano de carnes (Daeschel y col., 1992; Guerra y col., 2005a). Si bien en el presente estudio se obtuvieron resultados similares en la activación de la película T60XXB usando los métodos de inmersión y contacto, se seleccionó la activación por contacto (por flotación) debido al menor volumen de solución activa SABC usado.

IV.2.a.2 Selección de la solución de activación. Diseño factorial

Para obtener la combinación de condiciones óptimas para el desarrollo de un determinado experimento, el diseño experimental debe proporcionar un método que permita investigar simultáneamente los efectos de múltiples variables (factores) sobre una variable de salida (respuesta). A los fines de optimizar el proceso de activación de la película T60XXB, se desarrolló un diseño factorial que permitió combinar los factores tiempo (1, 2, 5, 12 y 24 h), solución de activación (SABC y SIBPP) y concentración (0,1 y 1%) y analizar su efecto sobre la variable respuesta (área de inhibición relativa). Las áreas de inhibición frente a *L. plantarum* CRL691

(lactocina 705) obtenidas luego del tratamiento de la película T60XXB con las soluciones de activación SABC y SIBPP se observan en la Figura 9a y b. Luego del análisis estadístico, los resultados del diseño factorial mostraron que usando la soluciones SABC 0,1 y 1% se obtuvieron áreas de inhibición de lactocina 705 en la película, que resultaron similares a las obtenidas por tratamiento con la solución isopropanólica SIBPP 1%. Asimismo, como se puede observar en la Figura 9b, el tratamiento con SIBPP 0.1% no produjo una película activa frente a *L. plantarum* CRL691.

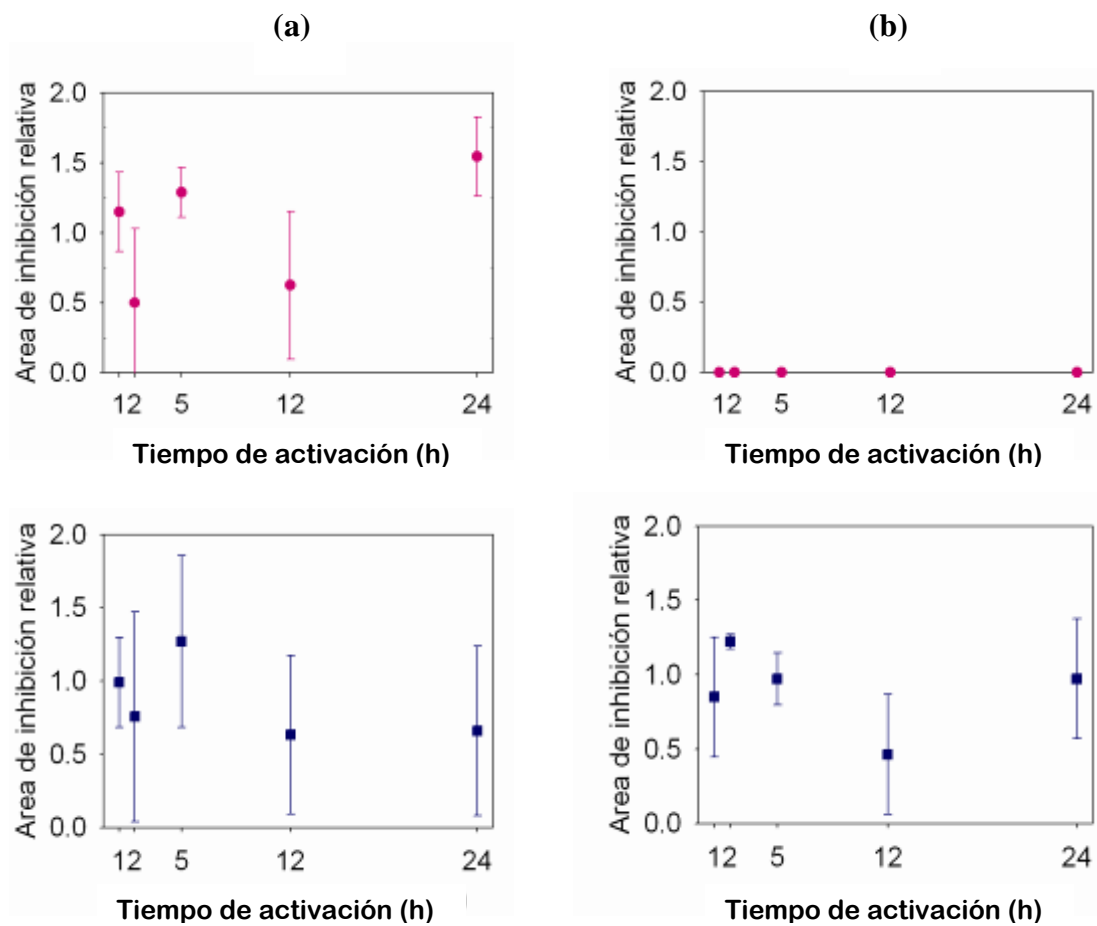


Figura 9 Área de inhibición relativa producida por lactocina 705 en las películas activadas con (a) SABPP y (b) SIBPP (●) 0.1% y (■) 1% durante diferentes tiempos

Cuando se ensayó la actividad antimicrobiana de la película tratada con distintas soluciones frente a *L. innocua* 7 (lactocina AL705), las áreas de inhibición relativas obtenidas en orden decreciente fueron para las soluciones SABC 1%, SABC 0.1% y SIBPP 1% (Fig. 10a y b). No se detectó actividad antimicrobiana en las películas cuando se usó SIBPP 0,1% como solución de activación.

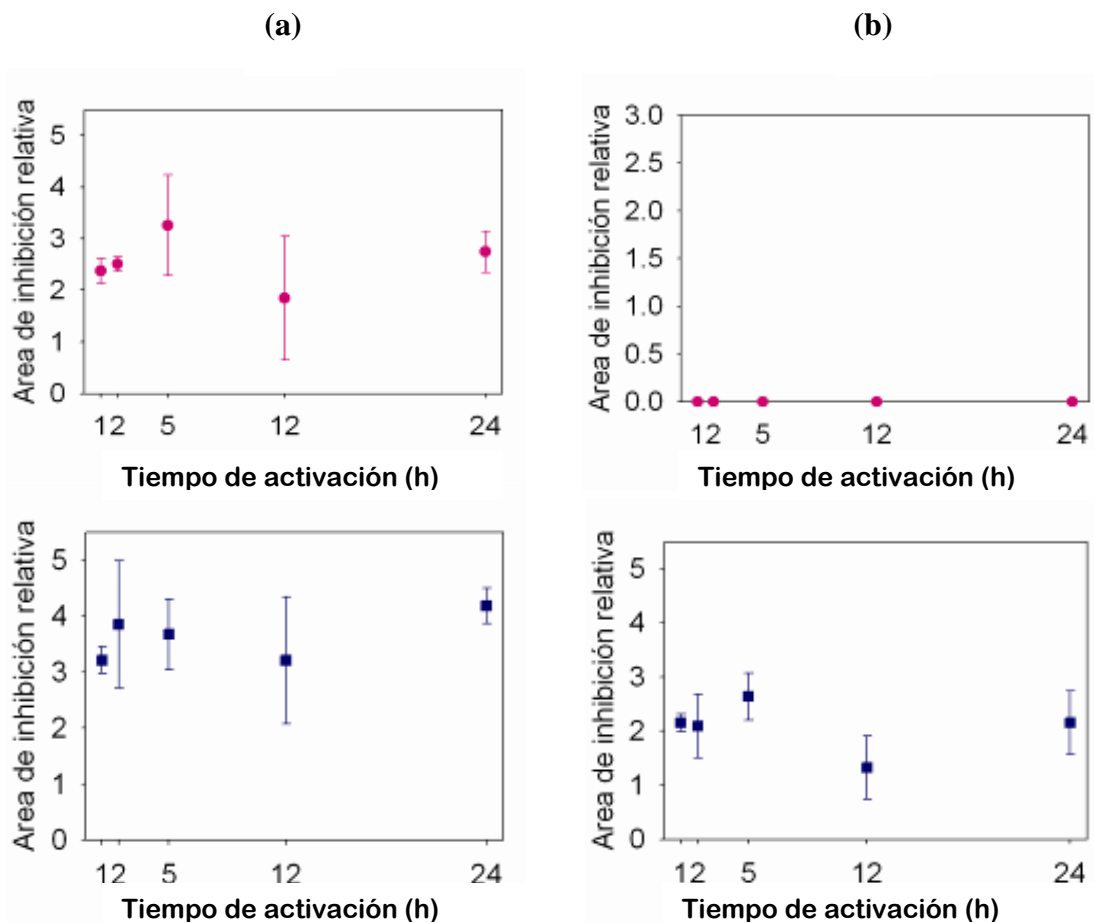


Figura 10. Área de inhibición relativa producida por lactocina AL705 en las películas activadas con (a) SABPP y (b) SIBPP (●) 0.1% y (■) 1% durante diferentes tiempos

Si bien se observó mucha dispersión en los valores de las áreas de inhibición para los diferentes tiempos de activación tanto para lactocina 705 como para lactocina AL705, la aplicación del test ANOVA mostró que no existían diferencias significativas entre ellas ($P \geq 0.05$). Estos resultados demostraron que el tiempo de activación no ejercía influencia en la actividad de la película a partir de 1 h y hasta 24 h de contacto, dentro del error experimental del método. El

diseño factorial también permitió seleccionar a la solución acuosa SABC como solución de activación, ya que se requirieron menores concentraciones de la misma para obtener una película con actividad antimicrobiana.

La metodología del diseño factorial requirió para cada combinación de factores y niveles (Sección II.8.a.2; Tabla 9) la preparación de una solución activa independiente. Así por ejemplo, para la combinación de la solución SABC de concentración 0,1% con un tiempo de contacto de 1 h se obtuvieron títulos diferentes de ambas bacteriocinas respecto a la combinación de SABC 0,1% y 2 h de contacto (Sección II.6; Tabla 8,). Por este motivo el desarrollo experimental de este diseño arrojó mucha dispersión en las áreas de inhibición obtenidas (Figs. 9 y 10). El diseño factorial utilizado en esta Sección, permitió tomar algunas decisiones respecto a la elección de condiciones de activación a saber: (i) selección del tiempo de contacto (1 h), (ii) selección de la solución de activación (SABC). Sin embargo, dada la gran dispersión de resultados obtenida en el diseño, para el estudio de la actividad inhibitoria mínima y el tiempo mínimo de activación (Sección siguiente), se modificó la metodología de trabajo.

IV.2.a.3 Determinación de la actividad inhibitoria mínima (AIM) y el tiempo mínimo de activación (TMA) en la película multicapa

A partir de la solución SABC, elegida como adecuada para la activación en el punto anterior, se prepararon varias diluciones de solución activa (Sección II.6; Tabla 8). La relación lineal entre concentración y título de las bacteriocinas presentes en las soluciones de activación se usó como criterio para la selección de las mismas. Los resultados mostraron que el título de lactocina AL705 en la solución SABC 0.05% presentaba un comportamiento no lineal respecto a su concentración. Asimismo el título de lactocina 705 en dicha solución resultó igual al presentado por SABC 0.1% (Fig. 11). Sin embargo, las soluciones SABC 0.01, 0.1, 0.5 y 1% mostraron una relación lineal entre el título de ambas bacteriocinas y la concentración, por lo tanto estas últimas fueron elegidas para la activación de la película T60XXB.

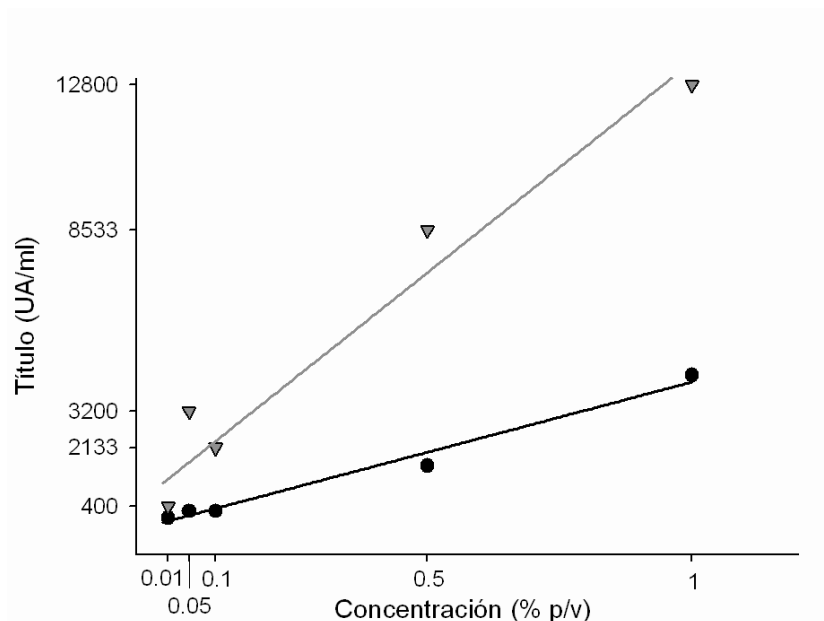


Figura 11. Título de (●) lactocina 705 y (▼) lactocina AL705 en función de la concentración de la solución de activación SABC

La AIM, definida como el menor título de bacteriocina (UA/ml) capaz de producir actividad antimicrobiana en la película, en el tiempo mínimo de activación (TMA), se determinó mediante el contacto de distintas concentraciones de la solución SABC con la película, durante diferentes tiempos. Cuando se utilizó como solución de activación la SABC exhibiendo las menores actividades antimicrobianas (Tabla 8) de lactocina 705 y AL705 (SABC 0.01%, 67 y 400 UA/ml, respectivamente), independientemente del tiempo de contacto, las películas obtenidas no produjeron halos de inhibición frente a *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7 (Fig. 12a y b, respectivamente). Sin embargo actividades mayores correspondientes a SABC 0.1, 0.5 y 1%, permitieron obtener actividad antimicrobiana en la película a partir de los 5 min de contacto, produciendo halos de inhibición frente a ambas cepas indicadoras. En particular para lactocina 705, a partir de los 60 min de contacto no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en el área de inhibición relativa de las películas obtenidas por contacto con SABC 0.1, 0.5 y 1%. Estos resultados sugieren que a partir de 1 h de contacto se alcanzaría el equilibrio de adsorción de lactocina 705 en la superficie de la película y que la solución de activación SABC 0.1% presentaría la AIM de dicha bacteriocina. Cuando se ensayó lactocina AL705 en las películas, se

observó el mismo comportamiento a partir de 60 min de contacto con SABC 0.1 y 0.5%, mientras que las áreas obtenidas con SABC 1% resultaron levemente mayores que las anteriores (Fig.12b).

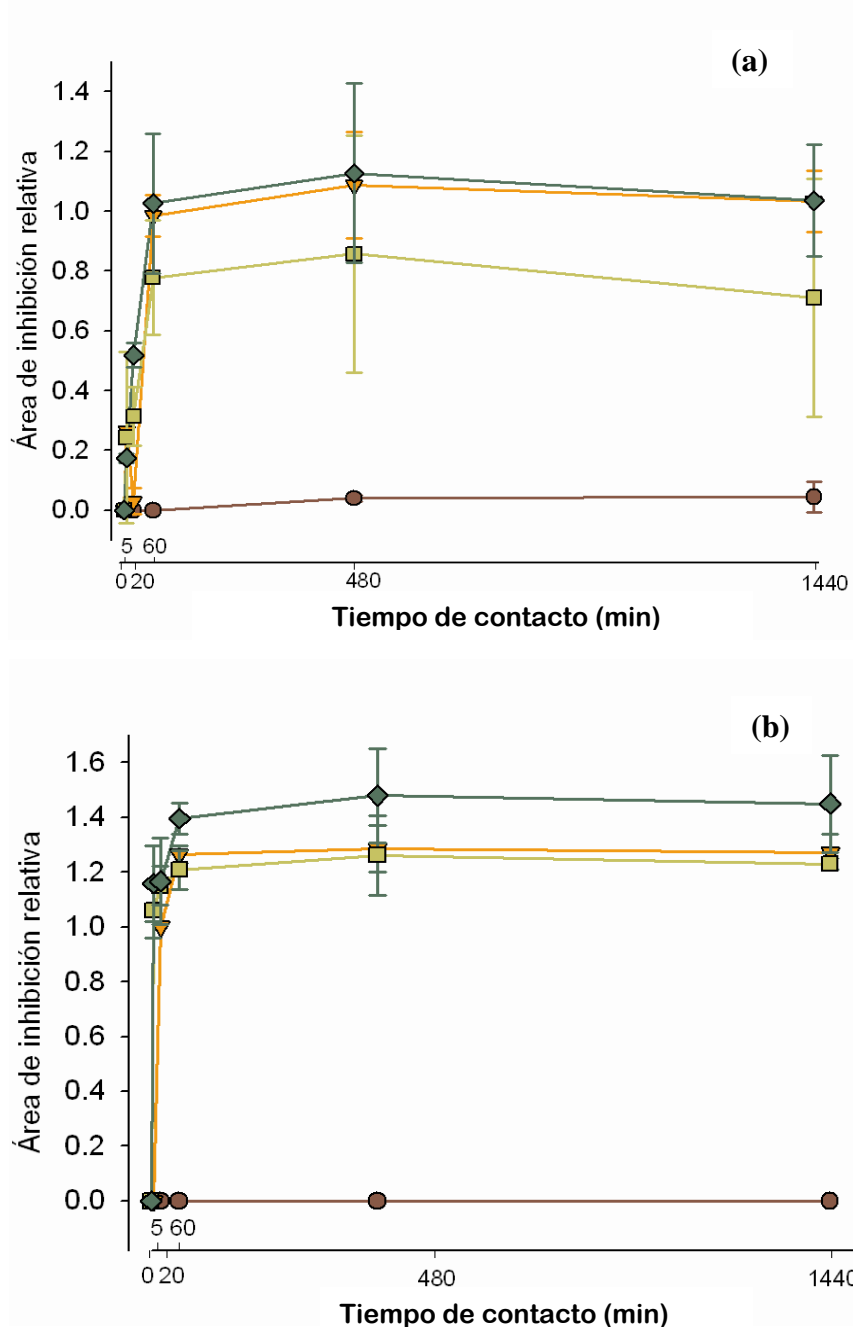


Figura 12. Actividad de (a) lactocina 705 y (b) AL705 en la película activada con SABPP (●) 0.01% (▼) 0.1% (■) 0.5% y (◆) 1%, cuyos títulos se presentan en la Tabla 8

La activación de películas plásticas comúnmente usadas en alimentos por contacto con soluciones activas se encuentra descrita en la bibliografía, siendo los tiempos de contacto informados de 48 h (lactocina 3147 adherida en una película de PE-PA) (Scannell y col. 2000) y 12 h (saturación de PET y goma con nisina) (Guerra y col. 2005b). En nuestro estudio, en base a los datos obtenidos para la activación de la película T60XXB con la solución conteniendo las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 (SABC), seleccionaron 1 h de contacto (TMA) y la solución de activación SABC 0.1% exhibiendo un título de 267 y 2133 UA/ml (Tabla 8), respectivamente para lactocina 705 y lactocina AL705 (AIM). Estos resultados serán nuevamente discutidos para lactocina 705 en el Capítulo V de esta Tesis.

IV.2.a.4 Influencia de la temperatura en la obtención de las películas activas

Se estudió la activación de la película multicapa por contacto con SABC 0.1% durante 1 h a 20, 30 y 40°C. Se observó actividad antimicrobiana en todas las temperaturas de activación ensayadas (Tabla 16), sin embargo se obtuvieron mayores halos de inhibición frente a *L. plantarum* CRL691 (lactocina 705) cuando el tratamiento con SABC se realizó a 30°C, mientras que la inhibición producida por lactocina AL705 resultó ser independiente de la temperatura de activación (Tabla 16). En el Capítulo V de esta Tesis se describe el estudio de adsorción de lactocina 705 en la película T60XXB, allí se presentan y discuten resultados sobre la dependencia de la adsorción de dicha bacteriocina con la temperatura. La temperatura seleccionada para obtener la película T60XXB activada con SABC 0,1% fue de 30°C, ya que con esta temperatura se obtuvo mayor actividad antimicrobiana en la película.

Tabla 16. Efecto de la temperatura en la activación de la película T60XXB

Temperatura de activación (°C)	Área de inhibición relativa	
	lactocina 705	AL705
20	0.1± 0.1 ^a	1.4± 0.2 ^a
30	0.9. ±0.2 ^b	1.5±0.2 ^a
40	0.2±0.2 ^a	1.3± 0.3 ^a

^{a-b} Valores seguidos de letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes (P< 0.05)

IV.2.a.5 Estabilidad y rendimiento de la solución de activación

El estudio de la estabilidad de la solución SABC 0,1% mostró que tanto en la forma deshidratada (BC) como en la resuspensión acuosa, lactocina 705 y lactocina AL705 conservaron su actividad durante 2 años de almacenamiento a -20° C (267 y 2133 UA/ml, respectivamente). Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores, quienes encontraron que las bajas temperaturas resultan apropiadas para la preservación de las bacteriocinas durante largos períodos de almacenamiento (Hsieh y Glatz, 1996; Ogunbanwo y col., 2003; Woo-Jin y col., 2008). Por otra parte, cuando se evaluó la posibilidad de reutilizar la misma solución SABC 0,1% para la activación de más de una película, se observó que solo la primera activación resultaba efectiva, originando una película capaz de inhibir a ambas cepas sensibles (Fig. 13). Si bien la solución SABC 0.1% se mantuvo activa luego del tratamiento de la primera película T60XXB, la pérdida en la capacidad de activación de la segunda película hizo imposible la reutilización de dicha solución para posteriores adsorciones de las bacteriocinas. La disminución de la concentración de bacteriocinas por debajo de la AIM (267 y 2133 UA/ml) necesaria para alcanzar el equilibrio de adsorción de lactocina 705 y AL705 podría explicar estos resultados.

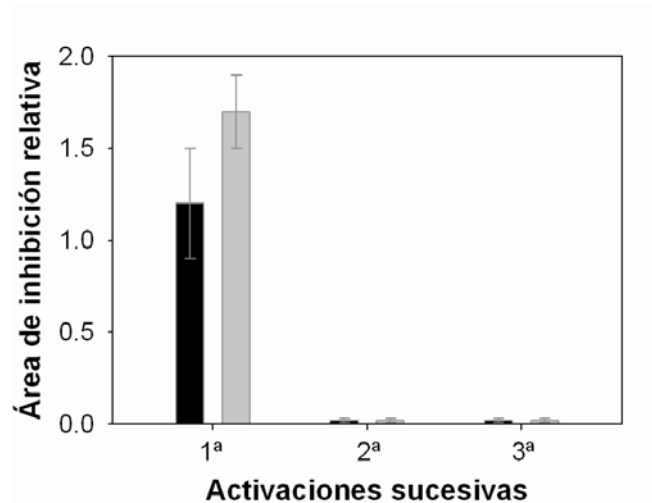


Figura 13. Actividad de (■) lactocina 705 y (■) AL705 en diferentes trozos de la película T60XXB (19.6 cm²) tratados secuencialmente con 4.6 ml de SABC 0.1%

IV.2.a.6 Obtención de la película T60XXB activada con nisina

Debido a que nisina es la única bacteriocina aprobada para su aplicación en alimentos, en este trabajo se la utilizó en la activación de la película multicapa para comparar su efectividad con la de lactocina 705 y AL705. Los títulos de las soluciones de Nisaplin® (1 y 0.1%) frente a *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7 se muestran en la Sección II.6; Tabla 8. Para títulos equivalentes de lactocina 705 y nisina (267 UA/ml, SABC 0.1% y Nisaplin® 0.1%; Tabla 8), las películas tratadas con nisina presentaron mayores áreas de inhibición frente a *L. plantarum* CRL691 usado como microorganismo indicador (Fig. 14), es decir que se observó mejor capacidad de activación de la película con nisina respecto a lactocina 705. Contrariamente, cuando se comparó la capacidad anti-*Listeria* de las bacteriocinas en la película multicapa, aún cuando la solución de Nisaplin® (1%) presentara mayor título que lactocina AL705 (SABC 0.1%) frente a *L. innocua* 7, (4267 y 2133 UA/ml, respectivamente; Tabla 8) se observó mayor efectividad de activación con la solución SABC, respecto a Nisaplin® (Fig. 14).

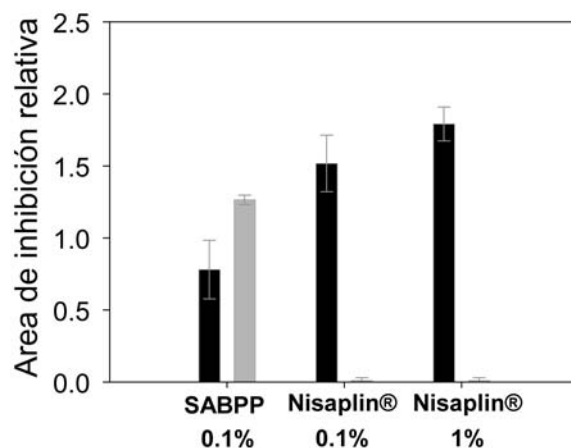


Figura 14. Área de inhibición relativa de la película activada con Nisaplin® (0.1 y 1%) y SABPP 0.1% frente a *L. plantarum* CRL691 (■) y *L. innocua* 7 (■)

Como se vió reflejado en el título de las soluciones de Nisaplin® (0.1 y 1%) (Sección II.6; Tabla 8), para una misma concentración de nisina *L. plantarum* CRL691 resultó ser más sensible a esta bacteriocina que *L. innocua* 7. A su vez, este comportamiento se reflejó en una menor sensibilidad de *L. innocua* frente a las películas activadas con nisina, comparada con *L. plantarum* CRL691. Resultados similares fueron encontrados por Cutter y Siragusa (1994, 1996) y Cutter y col. (2001) quienes reportaron que *L. innocua* era menos sensible a nisina respecto a otras bacterias como *B. thermosphacta* o *L. monocytogenes* Scott A. Asimismo, en otro estudio la sensibilidad de varias cepas de *Listeria* ensayadas frente a lactocina AL705, enterocina CRL35 y nisina mostró que las dos primeras bacteriocinas presentaban mayor actividad inhibitoria que nisina, sugiriendo que la susceptibilidad era dependiente de la cepa (Castellano y col., 2001). Además de nisina, otras bacteriocinas fueron aplicadas mediante diferentes métodos en materiales plásticos para la inhibición de *L. monocytogenes* en agar o sistemas alimentarios, tales como las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* 32Y y CWBI-B28 (Mauriello y col., 2004, Ercolini y col., 2006b, Ghalfi y col., 2006), lacticina 3147 producida por *Lact. lactis* subsp. *lactis* (Scannell y col., 2000) y pediocina producida por *Pediococcus acidilactici* (Ming y col., 1997).

IV.2.b Película obtenida a partir de un recurso renovable de origen agroindustrial

IV.2.b.1 Selección del material agroindustrial para la obtención de la película activa

Las películas obtenidas a partir de materiales de origen agroindustrial son elaboradas generalmente por casting de las soluciones filmogénicas en una superficie apropiada y posterior evaporación del solvente. Los materiales de origen agroindustrial disponibles para la obtención de películas poliméricas incluyen almidón, zeína, aislado proteico de soja y gluten, entre otros. Las condiciones de procesamiento necesarias para la obtención de soluciones filmogénicas varían de acuerdo al material utilizado, así por ejemplo cuando se trabaja con almidón, para lograr la disolución del polisacárido en agua, éste debe ser calentado junto con otros aditivos a 100°C (Zhang y Han, 2006) mientras que en la obtención de películas a base de zeína existe una etapa de calentamiento a 80°C (Ghanbarzadeh y Oromiehi, 2009, Marcos y col., 2007). El gluten y la proteína de soja, requieren en cambio calentamientos más suaves (40°C) para formar la solución filmogénica (Irissin-Mangata y col., 2001) y temperatura ambiente (Denavi y col., 2009), respectivamente. Asimismo, las propiedades de las películas obtenidas a partir de recursos renovables proteicos son altamente dependientes del pH de la solución filmogénica y generalmente son deficientes cerca del punto isoeléctrico de la proteína (Olabarrieta y col., 2006). En el caso del aislado proteico de soja, el punto isoeléctrico se encuentra alrededor de 4,5 en consecuencia para obtener películas a partir de estas proteínas deben usarse condiciones alcalinas (Ou y col., 2005; Wan y col., 2005, Denavi y col., 2009). Por otro lado, el gluten, con un punto isoeléctrico cercano a 7,5, permite obtener películas tanto a pH alcalino como ácido (Olabarrieta y col., 2006). Estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo mostraron que lactocina 705 y lactocina AL705 presentaban estabilidad térmica hasta temperaturas de 70°C y su actividad antimicrobiana resultó óptima en un rango de pH comprendido entre 3.0 y 6.0 (Tesis doctoral Palacios 2000; Tesis doctoral Castellano 2005). Como consecuencia, el gluten resultaría apropiado para la obtención de películas activadas con las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705, ya que en su

procesamiento se requiere una etapa de calentamiento suave para formar la solución filmogénica y permite obtener películas en un rango de pH ácido, condiciones que coinciden con aquellas en las que lactocina 705 y lactocina AL705 presentan óptima actividad antimicrobiana.

IV.2.b.2 Activación de la película de gluten. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de lactocina 705 y lactocina AL705

Se prepararon películas de gluten con una concentración de SABC de 0.01, 0.1 y 1 (% en solución filmogénica) y se ensayaron frente a *L. plantarum* CRL691 y a *L. innocua* 7. Para una concentración de 0.01% solo se observó actividad de lactocina AL705 en la película (Fig. 15), mientras que a partir de la concentración de 0,1% de SABC, se obtuvo actividad antimicrobiana de ambas películas (Fig. 15). La CIM, definida como la mínima concentración de SABC con la cual se obtuvo una película con actividad en toda la superficie frente a ambos organismos indicadores, fue de SABC 0,1%. Aún cuando los métodos de activación, así como la matrices poliméricas usadas fueron diferentes, se obtuvo el mismo valor de CIM (SABC 0.1%) tanto para la activación de la película T60XXB (Fig. 12), como para la película de gluten (Fig. 15). Sin embargo, aunque se utilizara la misma CIM en la activación de ambas películas, se obtuvieron mayores áreas de inhibición relativa de ambas bacteriocinas para la película de gluten (1.9 ± 0.3 y 2.3 ± 0.1 , respectivamente para lactocina 705 y AL705 (Fig. 27, Capítulo VI), respecto a las áreas obtenidas en la película T60XXB (0.9 ± 0.1 y 1.3 ± 0.1 , respectivamente para lactocina 705 y AL705) (Fig. 12). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta que la activación de la película de gluten requirió la inclusión de la SABC en la formulación, presentando actividad todo el componente activo incorporado; mientras que la activación de la película T60XXB se llevó a cabo por adsorción de bacteriocinas, donde la actividad antimicrobiana se vería limitada por la saturación de la película con bacteriocinas y la interacción con metabolitos producidos por *L. curvatus* CRL705. Estos últimos resultados se discutirán en el siguiente Capítulo.

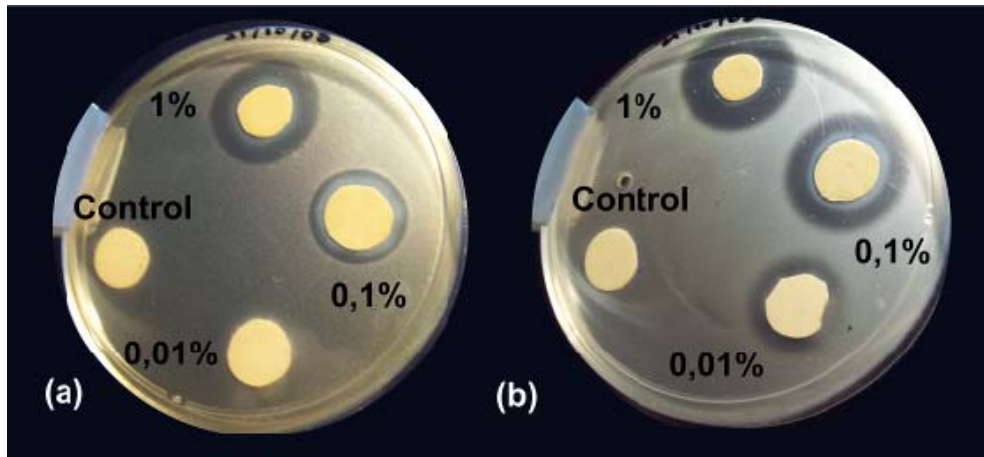


Figura 15. Actividad antimicrobiana de lactocina 705 (a) y lactocina AL705 (b) en la película de gluten conteniendo 0.01, 0.1 y 1% de SABC. La película control sin bacteriocinas fue formulada con SAIC (sección II.2.d)

IV.3 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la SABC 0.1% (267 y 2133 UA/ml de lactocina 705 y AL705, respectivamente) para activar la película multicapa (T60XXB) mediante el método de contacto durante 1 hora a 30°C. Tanto la solución conteniendo lactocina 705 y AL705 como su forma deshidratada fueron estables durante dos años de almacenamiento a -20°C. Cuando se evaluó la actividad anti-*Listeria* de películas activadas por contacto con nisina y las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705, lactocina AL705 adsorbida en la película fue capaz de inhibir *L. innocua* 7, mientras que la película activada con nisina (Nisaplin®) no presentó actividad inhibitoria.

Entre los recursos renovables disponibles se seleccionó el gluten como proteína más apropiada para la inclusión de bacteriocinas, teniendo en cuenta que el rango de temperaturas y pH para su procesamiento coincide con el de mayor actividad inhibitoria de lactocina 705 y AL705. La concentración de SABC a partir de la cual se obtuvo una película activa de gluten fue de 0,1%. Los resultados demuestran que las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 retienen la actividad antimicrobiana cuando se encuentran en la superficie de PEBDL de la película multicapa T60XXB o incluidas en una matriz de gluten.

CAPITULO V

ADSORCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *L. CURVATUS* CRL705 EN LA PELÍCULA MULTICAPA (T60XXB)

V.1 Introducción

Las bacteriocinas han demostrado capacidad para adsorberse en diferentes superficies (Bower y col., 2001, 2002; Joerger, 2007; Ryder y col., 2010). Esta característica es aprovechada para desarrollar barreras antimicrobianas aplicables a dispositivos de uso medicinal o materiales para envasar alimentos. En la literatura se encuentra un gran número de estudios cuyo objetivo es entender el fenómeno de adsorción de proteínas y péptidos en superficies (Hlady y Buijs, 1996; Wei y col., 2007; Tai y col., 2008; Rabe y col., 2011). En muchos casos la descripción de los fenómenos de adsorción se lleva a cabo a través de la aplicación del modelo de Langmuir. Este modelo es el más básico y describe la adsorción y desorción de partículas en sitios superficiales. A pesar de la general aceptación existente en la comunidad acerca de la escasa adecuación de este modelo para describir la adsorción de proteínas en superficies, el uso de Langmuir constituye el punto de partida para el desarrollo de descripciones teóricas de la adsorción de proteínas, ya que presenta un formato matemático simple (Rabe et al., 2011). Así por ejemplo, este modelo se ha utilizado para la descripción de la adsorción de bacteriocinas y proteínas en superficies (Daeschel y col., 1992; Wei y col., 2007).

La producción de bacteriocinas en gran escala puede obtenerse mediante el desarrollo de la cepa bacteriocinogénica en medios de cultivo. En este caso, las bacteriocinas obtenidas pueden estar acompañadas por impurezas que involucran metabolitos producidos por el microorganismo productor durante su crecimiento, así como componentes presentes en el medio de cultivo. Si bien las bacteriocinas pueden ser purificadas antes de ser utilizadas para la activación de un material polimérico, se puede observar (Capítulo III) que cada paso de purificación produce una reducción en la actividad antimicrobiana, requiriéndose mayores concentraciones de bacteriocinas purificadas para la activación de películas. Por esta razón, muchos estudios desarrollaron películas o superficies activas a partir del contacto con bacteriocinas concentradas acompañadas por impurezas del medio de cultivo (Bower et al., 1995; Scannell y col., 2000; Guerra et al., 2005a,b;

Ibarguren et al., 2010b). Sin embargo, se debe tener en cuenta que las impurezas que acompañan a las bacteriocinas podrían ejercer algún efecto durante el proceso de adsorción. La espectroscopía IR por Transformada de Fourier (IRTF) constituye una herramienta útil para identificar y caracterizar los componentes acompañantes de las bacteriocinas en las soluciones de activación. Esta técnica permite obtener espectros específicos para una dada cepa bacteriana, mostrando las características espectrales típicas de los componentes celulares como ácidos grasos, proteínas intracelulares y de membrana, polisacáridos y ácidos nucleicos (Vodnar y col., 2010). IRTF ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de microorganismos así como péptidos (Barth, 2000; Maquelin y col., 2002).

Con el objetivo de comprender y controlar la adsorción de bacteriocinas en la superficie de PEBDL de la película multicapa T60XXB, así como predecir la efectividad antimicrobiana de una película activada con bacteriocinas, en este capítulo se describen estudios de adsorción de lactocina 705 en el polímero comercial y su interacción con AL705 así como las impurezas producidas durante el crecimiento de la cepa productora *L. curvatus* CRL705 en el medio de cultivo. Los adsorbatos utilizados como fuente de bacteriocinas fueron caracterizados por espectroscopía IRTF para determinar la composición de los mismos.

V.2 Resultados y Discusión

V.2.a Caracterización de los adsorbatos por IRTF

Las bacteriocinas y otros metabolitos (impurezas) producidas por *L. curvatus* CRL705 durante su crecimiento, utilizados en este estudio para ser adsorbidos al material polimérico (adsorbatos) fueron BC, C-Sac7, C-AL705, P-AL705 y S-705 (Sección II.8.c.1; Tabla 10). Para su caracterización mediante IRTF, la asignación de bandas correspondiente a grupos funcionales relacionados con moléculas biológicas (proteínas, ácidos grasos y polisacáridos) se realizó de acuerdo a lo informado en trabajos de caracterización de microorganismos, péptidos y

aminoácidos (Quinteiro Rodríguez, 2000, Barth, 2000, Maquelin y col., 2002, Motta y col., 2008). En la Figura 16 se muestran los espectros de los adsorbatos indicando las bandas de absorción, cuya asignación se presenta en la Tabla 17. A partir de estos resultados puede inferirse que las bandas encontradas a 3500 y 3200 cm^{-1} , así como las correspondientes a la regiones de amida I (1700-1610 cm^{-1}) y II (1520-1500 cm^{-1}) presentes en todos los adsorbatos analizados, se corresponden con la naturaleza peptídica de las bacteriocinas. Por otro lado, el estiramiento del enlace C-H de ácidos grasos (2900-2800 cm^{-1}), la deformación C-H de compuestos alifáticos (1450 cm^{-1}), estiramiento de ésteres (1740 cm^{-1}), así como las bandas asociadas a deformaciones de carbohidratos (900-1200 cm^{-1}) se encontraron presentes en todos los adsorbatos obtenidos a partir de cultivos de cepas de lactobacilos usados en este estudio (BC, C-Sac7, C-AL705 y P-AL705), sin embargo estuvieron ausentes en la bacteriocina sintética, S-705 (Fig. 16). Estas bandas, encontradas diferencialmente en los adsorbatos de lactobacilos y ausentes en S-705, sugieren la presencia de impurezas constituidas por componentes del medio de cultivo, metabolitos del microorganismo productor, así como desechos celulares, ácidos nucleicos y moléculas alifáticas, entre otros. De manera similar, a partir de bandas características de ácidos grasos de pared de la célula bacteriana localizadas alrededor de 2845 y 2929 cm^{-1} y el pico específico de ácido láctico a 1127 cm^{-1} , se pudieron identificar diferentes BL probióticas así como la producción de ácido láctico (Vodnar y col., 2010). Notablemente, la banda encontrada a 1400 cm^{-1} (Fig. 16) correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace C=O de grupos carboxilato se vio disminuida en el espectro de P-AL705 (Tabla 17), adsorbato obtenido de la purificación de C-AL705 (bacteriocina concentrada obtenida de *L. curvatus* CRL1579, (Sección II.8.c.1; Tabla 10), sugiriendo este resultado que parte de los compuestos ácidos del medio de cultivo podrían haber sido removidos durante el proceso de purificación. Por otro lado, las bandas a 1439, 1200 y 1123 cm^{-1} presentes en S-705 y también incluidas en el espectro de BC (Fig. 16, Tabla 17) podrían asignarse a vibraciones correspondientes a cadenas laterales de aminoácidos (Barth, 2000) como el

estiramiento C-N de Histidina (1439 cm^{-1}), flexión Tyr-OH Tyrosina ($1169\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$) y estiramiento C-O de Aspartato ($1120\text{-}1253\text{ cm}^{-1}$), en coincidencia con los aminoácidos que forman parte de la secuencia de aminoácida de lactocina 705 (Cuozzo y col., 2000).

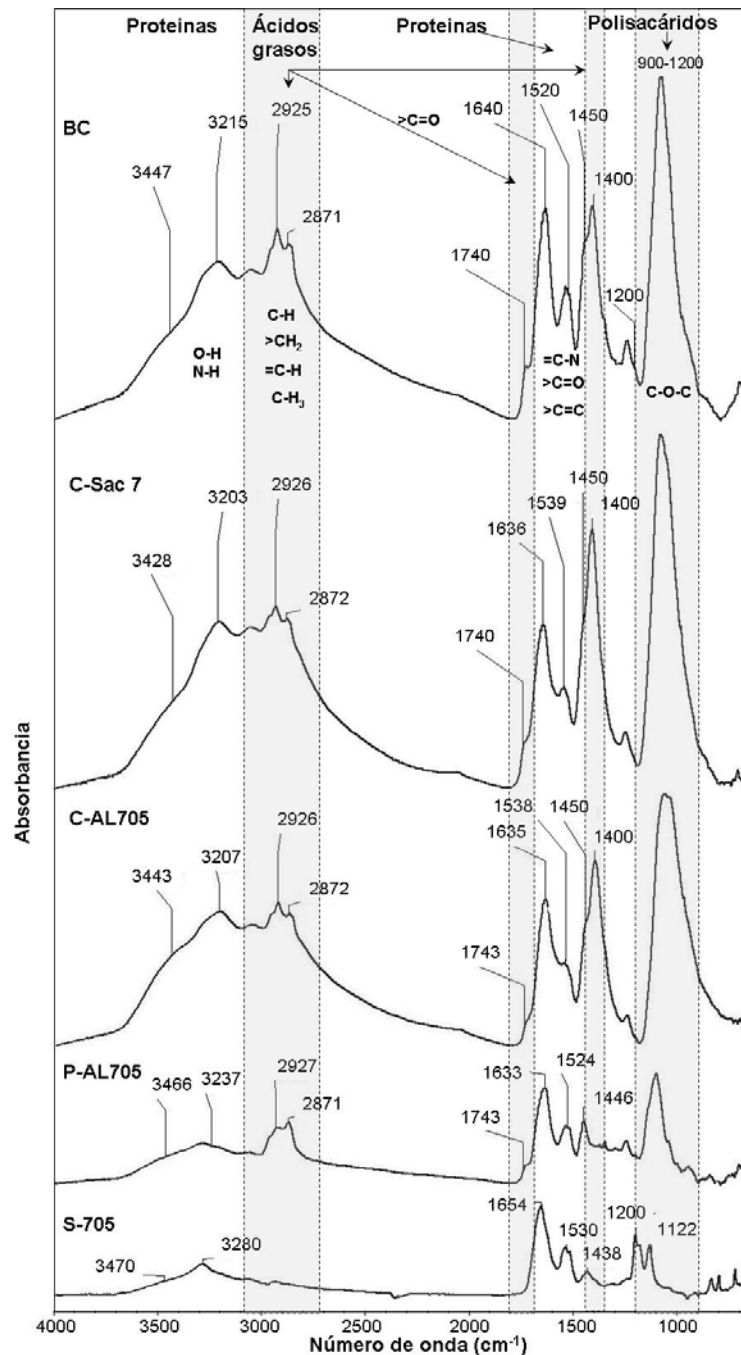


Figura 16. Espectros IRTF de los diferentes adsorbatos

La absorción IR de los aminoácidos de una proteína puede desviarse significativamente cuando ésta se encuentra en solución o cristalizada. El ambiente proporcionado por la proteína

puede modular la densidad eléctrica y polaridad de los enlaces, cambiando en consecuencia su frecuencia de vibración y coeficiente de absorción (Barth, 2000). Si bien los valores de absorción compilados en el trabajo de Barth (2000) para His, Tyr y Asp se encuentran en la zona espectral de las bandas diferenciales encontradas para S-705, estos valores solo se tomaron como una guía para la interpretación espectral, ya que las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo difieren de las utilizadas por Barth (2000); el adsorbato S-705 se encontraba como polvo sólido en contraste con aminoácidos en solución acuosa.

Tabla 17. Asignación tentativa de bandas de IRTF correspondientes a los diferentes adsorbatos (según Quinteiro Rodriguez, 2000, Barth, 2000, Maquelin y col., 2002 y Motta y col., 2008)

BC	Frecuencia (cm ⁻¹)				Frecuencia obtenida de bibliografía	Asignación posible ^a
	C-Sac7	C-AB	P-AB	S-705		
3447	3428	3443	3466	3470	~ 3500	str O-H de grupos OH
3215	3203	3207	3237	3280	3200	str N-H (amida A de proteínas)
2925	2926	2926	2927	-	2920	str sim CH ₂ (ácidos grasos)
2871	2872	2872	2871	-	2870	str CH ₃ sim (ácidos grasos)
1740	1740	1743	1743	-	1740	C=O str de ésteres (ácidos grasos)
1640	1636	1635	1633	1654	1700-1610	amida I (proteínas)
1520	1539	1538	1524	1530	1550-1520	amida II (proteínas)
1450	1450	1450	1446	-	1450	def C-H de alifáticos (ácidos grasos)
1400	1400	1400	-	-	1400	str sim C=O de COO ⁻
1200 ^b	-	-	-	1438, 1200, 1122	1438, 1200, y 1122	vib C-N, C-O cadenas laterales de aa
√	√	√	√	-	900-1200	str C-O, C-C y def C-O-H, C-O-C (glicopéptidos, fosfodiester, polisacáridos)

^a str: estiramiento; def: deformación; sim: simétrico; asim: asimétrico; vib: vibración; aa: amino ácidos

^b las bandas a 1198 y 1122 cm⁻¹ están incluidas en las bandas entre 900-1200 cm⁻¹

V.2.b Adsorción de lactocina 705 en la superficie de PEBDL de la película multicapa

V.2.b.1 Determinación de la CIM

En la Figura 17 se muestran los resultados obtenidos luego de tratar la película multicapa T60XXB con diferentes concentraciones de S-705. Cuando se utilizó una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ se observó un área de inhibición irregular, mientras que, se obtuvieron áreas uniformes cuando la película se trató con S-705 de 1 a 8 $\mu\text{g/ml}$ (200 a 6400 UA/ml).



Figura 17 Áreas de inhibición presentadas por la película multicapa T60XXB activada con diferentes concentraciones de S-705. Los números en la Figura indican las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de S-705 utilizadas

La tecnología para la obtención de superficies activas antimicrobianas requiere el estudio de la CIM de bacteriocina necesaria para la activación de dichas superficies. Guerra y col. (2005 a,b) estudiaron el equilibrio de adsorción de nisina en diversas superficies por contacto con soluciones de Nisaplín® con concentraciones desde 1200 a 12000 $\mu\text{g/ml}$ (con un contenido de nisina A pura de 300 y 3000 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Sin embargo, en estos estudios no se hace mención de la CIM de nisina pura necesaria para obtener una superficie activa. En este trabajo debido a la

obtención de una película con actividad en toda su superficie a partir del contacto con la solución S-705 de 1 µg/ml, esta concentración se definió como la CIM de lactocina 705 necesaria para la activación de la película T60XXB.

V.2.b.2 Efecto de la temperatura en la adsorción de lactocina 705

La adsorción de S-705 en la película a diferentes temperaturas se llevó a cabo utilizando la CIM de dicha bacteriocina obtenida previamente. En la Figura 18a y b se observa la variación de la concentración de bacteriocina en la solución de activación a 20, 30 y 40°C en presencia y ausencia (control) de la película multicapa. Se documentó una disminución de la concentración activa de 705 en función del tiempo y la temperatura. Cuando la temperatura aumentaba desde 20 a 40°C, esta disminución fue más marcada tanto en el control (Fig. 18 a) como en la solución en contacto con la película (Fig. 18b). Aún cuando la resistencia térmica de las bacteriocinas de clase II está ampliamente aceptada, la pérdida de actividad podría explicarse por los cambios estructurales en la región helicoidal de estos pequeños péptidos producidos por la temperatura (Kaur y col., 2004; Soliman y col., 2010). A pesar de la degradación producida por efecto de la temperatura en la solución control de S-705, cuando la película se puso en contacto con la solución de bacteriocina se observó una disminución más marcada de la concentración de lactocina 705 activa en solución, indicando que una concentración remanente de bacteriocina quedaba adsorbida en la película (Fig. 18c). Considerando que la temperatura puede tener efecto tanto en la cinética como en el equilibrio de adsorción, podría esperarse un aumento en las velocidades de adsorción debido a un incremento en la difusión de proteínas hacia el adsorbente. Por otro lado, los cambios estructurales dentro de la proteína y la liberación de moléculas de agua o iones adsorbidos son factores que contribuyen a la ganancia de entropía que impulsa la adsorción y que se ven favorecidos a elevadas temperaturas (Nakanishi y col. 2001; Rabe y col. 2011). En este estudio, si bien se detectó un aumento en la cantidad de lactocina 705 adsorbida cuando la temperatura

aumentó desde 20 a 30°C, no obstante se observó en forma paralela la mayor degradación de la bacteriocina al aumentar la temperatura, produciendo este efecto la disminución de la cantidad adsorbida a 40°C. Este efecto antagonista permitió definir 30°C como temperatura óptima de adsorción para 1 h de contacto. La adsorción de nisina en superficies a diferentes temperaturas fue estudiada por Guerra y col. (2005 a,b), quienes definieron 8°C como temperatura óptima de adsorción, dado que el aumento de temperatura producía menor adsorción por una disminución de las fuerzas atractivas entre el péptido y las superficies. En este estudio, debido al efecto antagonista de disminución de la concentración activa y aumento de la adsorción cuando la temperatura aumentaba, se obtuvo la máxima concentración de lactocina 705 activa en la película T60XXB cuando la temperatura de adsorción fue de 30°C; en consecuencia esta se definió como la temperatura óptima para la activación de la película.

V.2.b.3 Efecto del tiempo de contacto en la adsorción de lactocina 705

En la Figura 18d se observan las actividades antimicrobianas en agar semisólido cuando se alcanzó el equilibrio de adsorción en la película a los 20, 60 y 120 minutos para 40, 30 y 20°C, respectivamente. Se observó una actividad baja e irregular en la superficie de las películas tratadas durante 120 min (20°C) y 20 min (40°C), mientras que la película activada durante 1 h (30°C) presentó un halo de inhibición uniforme en toda la superficie. Estos resultados concuerdan con la mayor masa de bacteriocina adsorbida obtenida a 30°C ($0.07 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 60 min) en comparación con los valores encontrados para 20 y 40°C (Fig. 18c). El tiempo mínimo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción de lactocina 705 a 30°C (60 min) coincide con el encontrado anteriormente (Sección IV.2.a.3) para la adsorción de lactocina 705 y AL705 a partir de SABC. En la bibliografía se informaron tiempos de contacto mayores para lograr la adsorción de otros antimicrobianos como la bacteriocina anti-*Listeria* producida por *Enterococcus faecium* CRL1385 y nisina en silicatos y otras superficies de hidrofobicidad variable (Guerra y col., 2005a,b; Ibarguren y col., 2010b). Este hecho sugiere una mayor afinidad de lactocina 705 por la

película T60XXB, respecto a la afinidad de las bacteriocinas por las superficies anteriormente mencionadas.

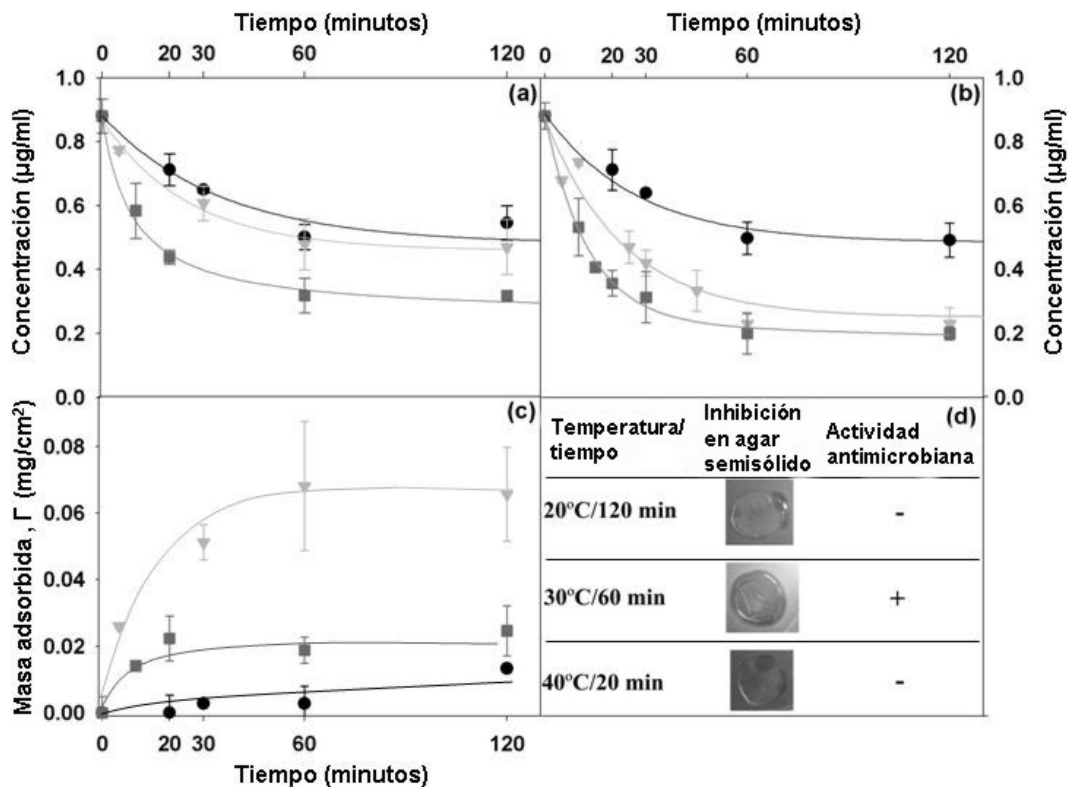


Figura 18. Cambios en la concentración activa de lactocina 705 durante 120 min a (●) 20, (▼) 30 y (■) 40°C. (a) S-705 en solución, (b) S-705 en contacto con la película multicapa, (c) masa activa de lactocina 705 adsorbida en la película multicapa y (d) actividad antimicrobiana correspondiente a lactocina 705 adsorbida

V.2.c Isotherma de adsorción de lactocina 705

En la Figura 19 se muestra la isoterma de adsorción de lactocina 705 en la superficie de PEBDL de la película multicapa (T60XXB) a 30°C. En el estudio de adsorción de proteínas, los resultados experimentales pueden ajustarse a la adaptación de diferentes modelos (Hlady y Buijs, 1996). Así por ejemplo, en estudios de adsorción de nisina sobre superficies con diferente hidrofobicidad, se describieron isotermas de adsorción formando monocapa (Daeschel y col., 1992), multicapas (Bower y col., 1995, Tai y col., 2008) o una combinación de ambos modelos (Guerra y col., 2005a). En los últimos años se han propuesto diferentes modelos para la adsorción

de proteínas (Rabe y col., 2011); entre ellos, el modelo de adsorción secuencial al azar (RSA, del inglés *Random Sequential Adsorption*) (Talbot y col., 2000) ha sido ampliamente aceptado para modelar la adsorción de proteínas en superficies (Ramsden, 1993; Guemouri y col., 2000); sin embargo, según nuestro conocimiento, no ha sido aplicado aún para la adsorción de bacteriocinas. Por tal motivo, en este estudio se usó el modelo de Langmuir (ecuación [7], Sección I.9.a) para poder comparar los resultados obtenidos con otros estudios de adsorción de bacteriocinas. La capacidad de adsorción de lactocina 705 en la superficie de la película multicapa ($0.72 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Fig. 19, ec [7], $R=0.9319$) se calculó a partir del equilibrio de adsorción de la bacteriocina, alcanzado después de una concentración de solución de contacto S-705 de $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($1600 \text{ UA}/\text{ml}$ lactocina 705), (concentración adsorbida Γ : $0.61 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; concentración de equilibrio [A]: $0,91 \mu\text{g}/\text{ml}$, Fig. 19).

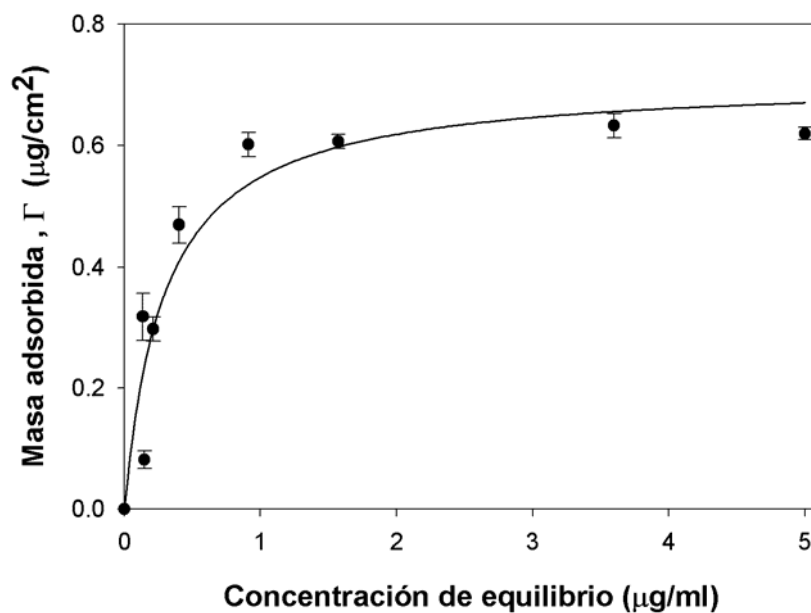


Figura 19. Isoterma de adsorción de lactocina 705 en la cara de PEBDL de la película multicapa (T6 XXB) a 30°C . Las barras de error indican desviaciones standard. La curva trazada entre los puntos sigue la

$$\text{ecuación de Langmuir } \Gamma = \frac{\Gamma_{\text{máx}} K_L [A]}{1 + K_L [A]} \quad (R = 0.9399)$$

Asimismo, a partir de esta concentración se observó un área de inhibición relativa constante en agar semisólido (Fig. 17). La capacidad de adsorción encontrada en nuestro estudio se

encuentra en el orden de los valores reportados por Guerra y col. (2005b) para nisina sobre polietilen-tereftalato (PET) y goma (0,665 y 0,697 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente), mientras que los valores informados para la adsorción de nisina en acero inoxidable resultaron menores (0,396 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

V.2.d Adsorción de las bacteriocinas en diferentes condiciones

V.2.d.1 Influencia de las impurezas y lactocina AL705 en la adsorción de lactocina 705.

Durante el crecimiento de BL bacteriocinogénicas (*L. curvatus* CRL705 y CRL1579), además de la producción de bacteriocinas, ocurre el catabolismo de los compuestos presentes en el medio de cultivo dando lugar a la acumulación de diversos catabolitos que, junto a componentes provenientes del medio de cultivo, actuarán como impurezas durante la adsorción de las bacteriocinas a la película multicapa. Por tal motivo, se investigó la influencia de dichas impurezas en la adsorción de lactocina 705 sobre la superficie de PEBDL. En base a la correlación lineal entre el área de inhibición de la película y la concentración de bacteriocina adsorbida en su superficie (Fig. 18c y d), para cuantificar las bacteriocinas adsorbidas en diferentes condiciones (Tabla 11, Sección II.8.c.4), se realizaron determinaciones en medio agar semisólido. Según esta correlación, los datos resultantes de la adsorción de lactocina 705 (Fig. 19) fueron evaluados en agar semisólido y sometidos a un tratamiento empírico siguiendo la ecuación de Langmuir (Fig. 20). Cuando la película fue tratada con el adsorbato S-705 (lactocina 705 sintética) en presencia de las impurezas producidas durante el crecimiento de la cepa Bac⁻ (C-Sac7; 0,1%), se observó una disminución en las áreas de inhibición relativas correspondientes a la meseta de la curva (saturación de la película) desde $3,7 \pm 0,1$ (S-705 sola) a $2,6 \pm 0,3$ (S-705 + C-Sac7; 0,1%) (Fig. 20). Sin embargo, en presencia de lactocina AL705 purificada (P-AL705, 2000 UA/ml), lactocina 705 presentó un área de inhibición mayor (3.0 ± 0.3). La disminución observada en el máximo de adsorción para lactocina 705 en presencia de P-AL705 y C-Sac 7 (conteniendo impurezas

producidas durante el crecimiento de las BL y restos de medio de cultivo) podría ser explicada por la presencia de proteínas, ácidos grasos y polisacáridos en los adsorbatos, como se mostró en el análisis mediante IRTF (Fig.16, Tabla 17). Los lípidos presentes entre las impurezas de los adsorbatos C-Sac7, BC y PA-L705 podrían interferir con la adsorción de lactocina 705, contribuyendo a la disminución de la actividad antimicrobiana observada (Fig. 20). Considerando que la cepa Sac7 difiere de *L. curvatus* CRL705 en su habilidad para fermentar sacarosa y producir bacteriocinas (lactocina 705 y lactocina AL705) y debido a que el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de ambas (MRS) no contiene sacarosa en su formulación, puede asumirse que las impurezas producidas por ambas bacterias podrían ser iguales. El mismo razonamiento se aplicó para *L. curvatus* CRL1579, cuyas modificaciones genéticas respecto a *L. curvatus* CRL705 no afectarían las reacciones catabólicas.

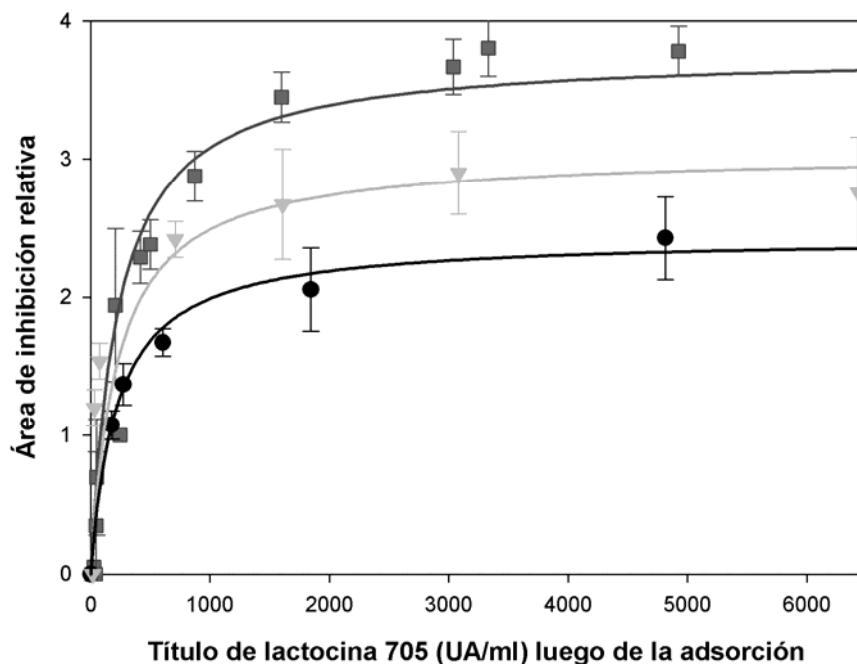


Figura 20. Actividad antimicrobiana de lactocina 705 en la película multicapa obtenida a 30°C a partir de (■) S-705; (▼) S-705 + P-AL705 (12800 UA/ml) y (●) S-705 + C-Sac 7 (0,1%) (Sección II.8.c.4; Tabla 11)

Con el objeto de simular las condiciones encontradas en la SABC (solución acuosa de bacteriocinas concentrada) 4% (6400 UA/ml para lactocina705 y 12800 UA/ml para lactocina

AL705), se prepararon soluciones de adsorción combinando lactocina 705 (S-705, 6400 UA/ml) con lactocina AL705 (P-AL705 12800 UA/ml) y con diferentes concentraciones de impurezas (C-Sac7 0,01; 0,1; 2 y 4%). Los resultados mostraron que el área de inhibición relativa de lactocina 705 obtenida a partir de la combinación de S-705 y P-AL705 fue similar a la obtenida con la combinación de S-705 con C-Sac7 0,01% (Tabla 18). Asimismo, se encontró que el área de inhibición relativa de lactocina 705 en la película disminuía significativamente ($P < 0.05$) a medida que la concentración de impurezas aumentaba (Tabla 18). Cuando la película se trató con C-Sac7 (2% y 4%), el área de inhibición relativa de 705 en las películas (1.6 ± 0.3 y 1.1 ± 0.5 , respectivamente) fue similar a la obtenida para esta bacteriocina a partir de la SABC 4% (Tabla 18).

Cuando se considera la adsorción de proteínas y péptidos a partir de una mezcla, el patrón de adsorción es el resultado de la combinación entre procesos de transporte, adsorción y repulsión (Rabe et al., 2011). Las proteínas pequeñas difunden más rápido que las de mayor tamaño y son las especies dominantes en los estadios tempranos de adsorción. Sin embargo, las proteínas de mayor tamaño se unen típicamente con mayor fuerza debido a su mayor superficie de contacto y pueden incluso repeler a otras proteínas previamente adsorbidas (Lutanie y col., 1992; Nasir y McGuire, 1998). En consecuencia, la masa total de proteínas adsorbidas a partir de mezclas atraviesa un máximo durante el proceso de adsorción (Andrade y Hlady, 1986). En el presente estudio, la pronunciada disminución en el área de inhibición relativa de lactocina 705 con el aumento de C-Sac7, podría sugerir una adsorción competitiva entre la bacteriocina y las moléculas presentes en C-Sac7 (ácidos grasos, péptidos o proteínas). De forma similar, la disminución en la actividad antimicrobiana de lactocina 705 en la película en presencia de P-AL705 y a partir de SABC (Tabla 18), podría ser adjudicada a una adsorción competitiva entre las bacteriocinas y las impurezas provenientes del crecimiento de BL.

Tabla 18. Actividad antimicrobiana de la película contactada (1 h, 30 °C) con diferentes combinaciones de adsorbatos

Adsorbato I	Adsorbato II	Área de inhibición relativa de	
		lactocina 705	lactocina AL705
	–	3.7 ^a ± 0.1	–
	C-Sac7 (0.01%)	3.2 ^b ± 0.3	–
S-705	C-Sac7 (0.1%)	2.6 ^c ± 0.3	–
(6400 UA/ml lactocina 705)	C-Sac7 (2%)	1.6 ^d ± 0.3	–
	C-Sac7 (4%)	1.1 ^d ± 0.5	–
	P-AL705 (12800 UA/ml AL705)	3.0 ^b ± 0.3	2.1 ^a ± 0.2
SABC 4% (6400 y 12800 UA/ml, respectivamente lactocina 705 y AL705)		1.4 ^d ± 0.4	2.3 ^a ± 0.2
P-AL705 (12800 UA/ml AL705)		–	2.1 ^a ± 0.2
C-AL705 (12800 UA/ml AL705)		–	2.2 ^a ± 0.1
S-705 (6400 UA/ml 705)*	C-Sac7 (4%)*	1.5 ^d ± 0.1	–
C-Sac 7 (4%)*	S-705 (6400 UA/ml 705)*	3.3 ^a ± 0.4	–

^{a-d} valores seguidos por letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

*adsorción secuencial (Sección II.8.c.4)

A los fines de evaluar la adsorción competitiva entre 705 y las impurezas generadas por las cepas productoras, se llevó a cabo un experimento de adsorción secuencial (Sección II.8.c.4) y se comparó con los datos obtenidos a partir de la SABC 4%. Se encontró que cuando se ponía en contacto la película con S-705 y posteriormente con C-Sac7 (4%), los valores de inhibición obtenidos no presentaban diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con los obtenidos con la película tratada con SABC 4% (1.5 ± 0.1 y 1.4 ± 0.4 , respectivamente). En cambio, el área de inhibición obtenida al tratar la película primero con C-Sac7 (4%) y luego con S-705 (3.3 ± 0.4) fue similar a la obtenida por tratamiento con S-705 sola (3.7 ± 0.1) (Tabla 18). Estos resultados podrían sugerir

que las impurezas de C-Sac7 no serían adsorbidas en la superficie de PEBDL de la película multicapa.

V.2.d.2 Influencia del contenido de impurezas y la presencia de lactocina 705 en la adsorción de lactocina AL705

Lactocina AL705 se adsorbió en la superficie de PEBDL de la película T60XXB siguiendo un comportamiento tipo Langmuir (Fig. 21), los resultados mostraron que se obtenía una meseta en el área de inhibición relativa de la bacteriocina (saturación de la película) a partir de un título de 300 UA/ml en la solución de contacto.

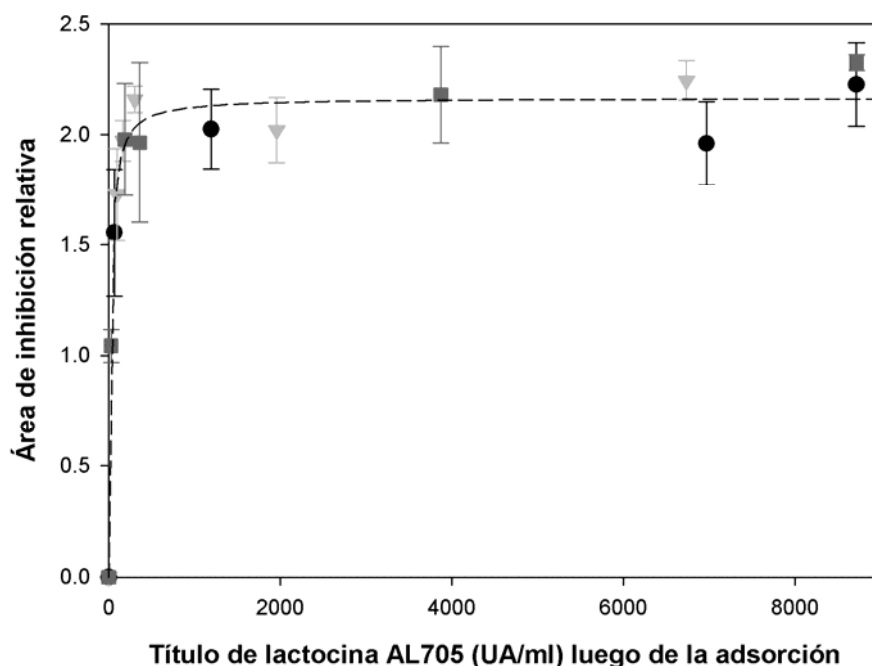


Figura 21. Actividad antimicrobiana de lactocina AL705 en la película multicapa obtenida a 30°C a partir de (●) P-AL705 sola; (▼) en presencia de S-705 (6400 UA/ml) y (■) a partir de C-AL705 (Sección II.8.c.4; Tabla 11)

Cuando se evaluó el efecto del contenido de impurezas en la adsorción de lactocina AL705 por comparación entre las áreas obtenidas a partir de P-AL705 y C-AL705 (Fig. 21), no se obtuvieron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los valores de áreas de inhibición encontrados (P-AL705; $2,1 \pm 0,2$ y C-AL705; $2,2 \pm 0,1$) (Tabla 18). La adsorción de lactocina AL705 en la

película tampoco se vio influenciada por la presencia de lactocina 705 (6400 UA/ml) (Fig. 21), ya que el área obtenida fue similar cuando la película se trató solo con P-AL705 ($2,1\pm 0,2$), la combinación de P-AL705 y S-705 ($2,1\pm 0,2$) o cuando se trató con SABC 4% ($2,3\pm 0,2$) (Tabla 18).

V.2.e Racionalización de resultados

A partir de los resultados obtenidos (Figs. 20 y 21, Tabla 18), se propuso una racionalización de resultados (Fig. 22) en base a los datos reportados previamente referentes a la interacción de los péptidos lac705 β y lac705 α (que componen lactocina 705) con membranas biológicas (Castellano y col., 2007), así como datos sobre el comportamiento de las bacteriocinas clase IIa en presencia de dichas membranas (Uteng y col., 2003; Drider y col., 2006; Nissen-Meyer y col., 2010). La adsorción de lactocina 705 en la superficie de PEBDL (cara interna del film multicapa T60XXB) se produciría a través interacciones hidrofóbicas con el péptido lac705 β , produciendo dichas interacciones cambios conformacionales en el péptido (Fig. 22a). Estos cambios podrían aumentar la afinidad del péptido lac705 β por las impurezas presentes en C-Sac7, P-AL705 y SABC, evitando que lac705 β y lac705 α se complementaran para ejercer la actividad antimicrobiana de lactocina 705 (Fig. 22b). De esta manera, se justificaría la disminución de actividad de lactocina 705 observada en la película en presencia de adsorbatos que contienen impurezas generadas por el crecimiento de BL (Fig. 20). En la bibliografía se encuentran documentados cambios conformacionales en proteínas debido a interacciones hidrofóbicas con superficies (Norde y col., 1986; Kim y Yoon, 2002; Roach y col., 2005). Asimismo, en estudios previos de la interacción entre S-705 y una membrana bi-lipídica se informaron importantes cambios conformacionales del péptido lac705 β quien interactuaba con el corazón hidrofóbico de la membrana, mientras que el péptido lac705 α inducía deshidratación en la región interfacial (Castellano y col., 2007). La presencia de ácidos grasos, evidenciada mediante IRTF, en C-Sac7,

BC y P-AL705 (Fig. 16, Tabla 17), estarían interfiriendo con lactocina 705 adsorbida, contribuyendo a la disminución de actividad observada (Fig. 20).

Por otra parte, debido a su actividad anti-*Listeria*, se cree que lactocina AL705 podría pertenecer a la clase IIa de bacteriocinas (Castellano y col., 2008). Este grupo de péptidos antimicrobianos está compuesto por moléculas simples en contraste con las de la clase IIb (bacteriocinas multi-componentes). De los resultados obtenidos para la adsorción de AL705 en diferentes condiciones, podría sugerirse que lactocina AL705 se adsorbería en la película y no ocurrirían interacciones con impurezas luego de la adsorción (Fig. 22c). Asimismo, debido a que no se observaron diferencias en las áreas de inhibición relativas de AL705, cuando P-AL705 se combinó con S-705, respecto a P-AL705 sola, se puede sugerir que el número de moléculas de AL705 sería el mismo cuando ésta se adsorbe sola o en presencia de lactocina 705. La adsorción de AL705 sola podría estar ocurriendo de forma que su eje mayor se presentara paralelo a la superficie de la película (*side-on*, Fig. 22c), cubriendo la misma con un cierto número de moléculas. Este número de moléculas de AL705 se podría mantener constante si en presencia de S-705, ocurrieran reordenamientos hacia una orientación perpendicular (*end-on*, Fig. 22d), adsorbiéndose lactocina 705 en las superficies no cubiertas. De esta manera, y como se infiere de los resultados obtenidos, se mantendría la actividad inicial de AL705 aún en presencia de lactocina 705 adsorbida. Estos resultados coinciden con los reportados para la adsorción de fibrinógeno en superficies hidrofóbicas, proteína que en una etapa inicial se adsorbe en configuración *side-on* y luego, debido a la alta concentración de proteína en el medio circundante, se producen reacomodamientos a una posición perpendicular (*end-on*), permitiendo que otras moléculas de proteína se adsorban en la superficie libre (Roach y col., 2005).

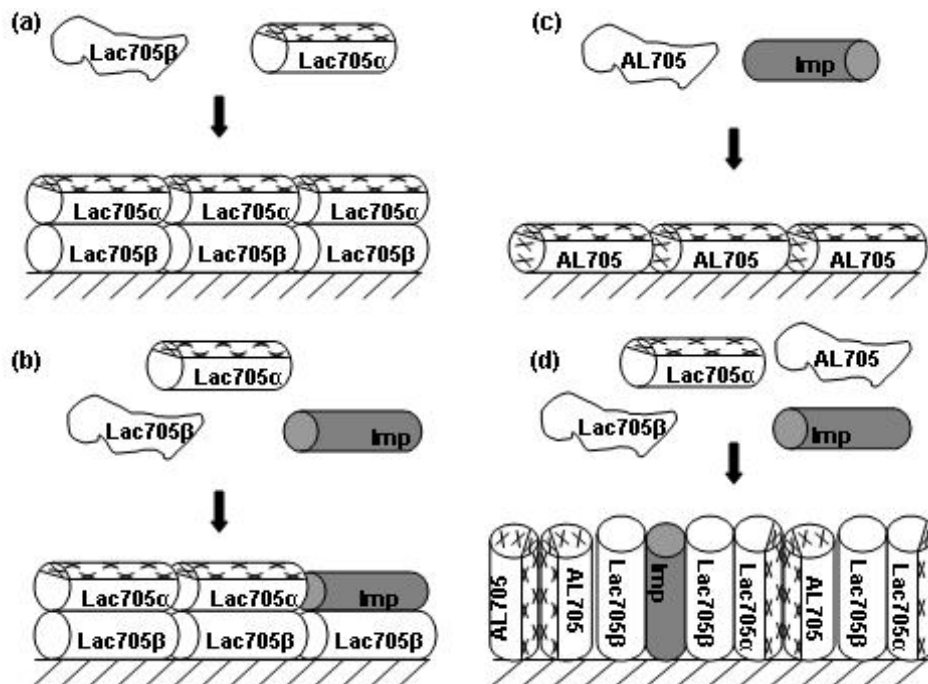


Figura 22. Esquema propuesto para visualizar la adsorción de bacteriocinas a partir de diferentes fuentes (a) lactocina 705 a partir de S-705, (b) 705 en presencia de impurezas (Imp), (c) lactocina AL705 en presencia de impurezas y (d) 705 en presencia de AL705 e impurezas. Las zonas marcadas (X) y sin marcar en la figura indican respectivamente zonas hidrofílicas e hidrofóbicas de los péptidos

V.3 Conclusiones

En este capítulo se realizó una contribución a la comprensión del proceso de adsorción de bacteriocinas en una película multicapa de cara interna de PEBDL, en presencia de impurezas producidas por BL. Se establecieron las condiciones óptimas para obtener una película activada con lactocina 705. Se encontró que lactocina 705 y AL705 se adsorben en la superficie de PEBDL de la película T60XXB siguiendo un comportamiento tipo Langmuir. A partir una concentración de 1600 UA/ml para lactocina 705 y 300 UA/ml para AL705 en la solución de contacto (Figs 20 y 21) se obtuvo una superficie de PEBDL saturada por cada bacteriocina. Se caracterizaron diferentes fuentes de bacteriocinas y se compararon respecto a su capacidad para adsorberse en la película produciendo actividad inhibitoria frente a diferentes microorganismos, incluyendo actividad anti-*Listeria*. La técnica de espectroscopía IRTF demostró ser una herramienta útil para caracterizar los adsorbatos de diferentes fuentes. Las impurezas generadas durante el crecimiento

de *L. curvatus* CRL705 y CRL1579, utilizadas como fuentes de bacteriocinas, influyeron fuertemente en la adsorción y actividad antimicrobiana de lactocina 705 en la película, mientras que no se encontraron evidencias de tal efecto sobre la adsorción de lactocina AL705. Asimismo, la actividad de AL705 adsorbida en la película no se modificó por la presencia de 705 en el medio de adsorción. Estos resultados fueron racionalizados y se propuso un mecanismo de adsorción para las bacteriocinas, del cual se sugirió que en presencia de impurezas producidas por el crecimiento de BL, los péptidos lac705 β y lac705 α no se podrían complementar, disminuyendo en consecuencia su actividad antimicrobiana en la película multicapa. Esta interacción con las impurezas no ocurriría cuando lactocina AL705 se adsorbe en la película. La adsorción de AL705 no se vería afectada por la presencia de lactocina 705, debido a un reorientamiento conformacional de AL705 adsorbida. De esta manera la película mantendría sus propiedades anti-*Listeria*, mientras adquiere actividad frente a otras BL por la adsorción superficial de lactocina 705.

Las bacteriocinas obtenidas a partir del crecimiento de *L. curvatus* CRL705 en MRS pueden utilizarse para ser adsorbidas en una superficie de PEBDL, ofreciendo un método simple para producir películas activas con propiedades anti-*Listeria*.

CAPÍTULO VI

CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS OBTENIDAS

VI.1.Introducción

Una de las funciones primarias del envase alimentario es la protección del alimento de los factores ambientales como el agua, vapor de agua, gases, aromas, microorganismos, polvo, golpes, vibraciones, fuerzas compresivas, etc. Para la mayoría de los productos alimenticios, la protección ofrecida por el envase constituye un elemento esencial del proceso de preservación. Por ejemplo, la leche envasada asépticamente en envases laminados, permanece en estado aséptico solo durante el tiempo que el envase le provee protección; la carne envasada al vacío no alcanzará su tiempo de vida útil deseado si el envase permite permeación del oxígeno. En general, una vez que se pierde la integridad del envase, el producto queda expuesto a las condiciones ambientales y no puede preservarse por más tiempo.

El envase también puede ejercer influencia en la inocuidad del alimento desde el punto de vista microbiológico. En primer lugar, si el material de empaque no provee una barrera adecuada alrededor del alimento, los microorganismos pueden contaminarlo transformándolo en inseguro para el consumo humano. También puede existir contaminación microbiana si el material de empaque permite la transferencia de, por ejemplo, humedad u oxígeno desde la atmósfera al alimento. En esta situación, los microorganismos presentes en el alimento que no representan un riesgo debido a la ausencia de estos factores, pueden recuperar la capacidad de crecer y convertirse en un riesgo para el consumidor. En consecuencia, la vida útil de alimentos microbiológicamente perecederos depende en gran medida de propiedades del envase tales como la barrera a los gases y vapor de agua, la modificación de la atmósfera que rodea al alimento y la actividad del envase. Estas variables afectan la microbiota presente en el alimento, la velocidad de deterioro debido al crecimiento microbiano y el tiempo que tarda el alimento en ser microbiológicamente inaceptable (Lee, 2010).

Cuando se activa un material polimérico para otorgarle propiedades antimicrobianas, pueden verse afectadas varias características físicas, así como su procesabilidad. Las propiedades

generales del material incluyen propiedades mecánicas como la tensión, elongación, resistencia al desgarro, rigidez, y propiedades físicas como la permeabilidad al oxígeno, vapor de agua y otros gases, hidrofobicidad, hinchamiento por absorción de agua, resistencia a las grasas, brillo, transparencia, capacidad anti-niebla y otras (Han, 2000). El grado de variación de estas propiedades luego de la activación dependerá del agente antimicrobiano utilizado, las características del material polimérico, así como el método de activación (inclusión del antimicrobiano en la matriz polimérica, casting sobre la superficie del polímero, adsorción, etc.) (Bastarrachea y col., 2011).

Luego de la obtención de un material polimérico activo deben predecirse las temperaturas de producción y distribución del alimento para determinar su efecto en la actividad antimicrobiana residual (Kraśniewska y Małgorzata, 2012). En particular, se sabe que las películas de gluten tienden a envejecer debido a la agregación u oxidación proteica y, en consecuencia la ductilidad del material disminuye, mientras que la rigidez y tensión aumentan, incrementando la fragilidad de las películas (Morel y col., 2000; Micard y col., 2000; Olabarrieta y col., 2006). En consecuencia, para el diseño de materiales activos a partir de una película de proteínas como el gluten, resulta de vital importancia determinar si los cambios producidos en la matriz polimérica debidos al envejecimiento, producen algún efecto en la efectividad antimicrobiana de la película.

Otro factor a tener en cuenta es la influencia que pudieran ejercer los componentes del alimento en la actividad antimicrobiana del material diseñado. Así por ejemplo, se ha reportado que la composición y el pH del alimento influyen negativamente en la actividad antimicrobiana de películas de PEBDL activadas con hexametileno tetraamina (Devlieghere y col., 2000). La presencia de factores desnaturalizantes como proteasas o glutatión también producen una disminución en la actividad antimicrobiana de películas activadas con nisina (Millette y col., 2007). Asimismo, la velocidad y cantidad de antimicrobiano liberado desde el material activo al alimento resulta de gran importancia. Se deben realizar estudios de migración para obtener

información sobre la velocidad y cantidad de sustancia activa liberada que se requiere para tener el efecto antimicrobiano deseado. La cinética de liberación debe ser diseñada para controlar la cinética de crecimiento de los microorganismos sensibles y mantener la concentración del agente activo encima de la concentración inhibitoria mínima (Han, 2000). Así por ejemplo, la rápida liberación de triclosán desde la película activa en contacto con una solución de etanol sugiere que esta película no sería apta para ser usada en alimentos grasos; mientras que por el contrario, la retención de nisina por uniones químicas en una matriz polimérica de hidroxipropil-metil celulosa entrecruzada, no permite que esta bacteriocina pueda ejercer sus propiedades antimicrobianas desde la matriz (Chung y col., 2003; Sebti y col., 2003).

En el presente Capítulo se llevó a cabo la caracterización de las películas activas obtenidas en el Capítulo IV. En una primera etapa se determinaron las propiedades mecánicas, superficiales, permeabilidad al vapor de agua y migración de las películas activas. Las propiedades obtenidas se compararon con las de sus respectivos controles sin activar con el objetivo de evaluar la influencia de la activación en las propiedades iniciales de películas poliméricas. En una segunda etapa de caracterización se estudió la estabilidad antimicrobiana de las películas activas en función del tiempo y la influencia de simulantes de alimentos (agua y aceite de girasol) en la actividad antimicrobiana. Asimismo, se estudió la influencia del envejecimiento de la película de gluten en el desempeño de su actividad antimicrobiana. Se presentan por separado los resultados obtenidos para la película multicapa y la de gluten.

VI.2 Resultados y Discusión

VI.2.a Película multicapa antimicrobiana

VI.2.a.1 Migración total, propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua.

Las propiedades mecánicas así como la permeabilidad al vapor de agua de la película multicapa activada por contacto con la solución acuosa e bacteriocinas concentrada (SABC) no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) respecto a la película control sin activar (Tabla 19). La activación de películas de PE por inclusión de antimicrobianos en la matriz polimérica produjo variación en las propiedades de barrera cuando se le incorporó linalol o metilchavicol, así como en las propiedades mecánicas, barrera y de sellado cuando se incluyeron anhídrido benzoico o parabenos en el polímero (Suppakul y col., 2006; Dobias y col., 2000). En nuestro estudio, dado que la activación se llevó a cabo por adsorción de las bacteriocinas en la superficie, las propiedades de la película multicapa activada por contacto con la SABC no variaron luego de la activación. Resultados similares fueron documentados por Mauriello y col. (2004), quienes encontraron que la activación de una película de PE-OPA por contacto con una bacteriocina anti-*Listeria* no alteraba las propiedades mecánicas iniciales de la película. Los valores de migración total hallados para ambas películas (Tabla 19) se encontraron por debajo de 1 mg/dm^2 , cumpliendo ambos con el límite de migración total, 8 mg/dm^2 , establecido en la Resolución Mercosur GMC 56/92.

Tabla 19. Permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas y resultados de migración de la película T60XXB activada con SABC 0,1% y un control sin activar

Muestra	Tensión en el punto de rotura (MPa)	Deformación% en el punto de rotura	Permeabilidad al vapor de agua (mol/ Pa m s)	Migración total (mg/dm ²)
Película activa	49±3 ^a	377 ± 19 ^b	2. 10 ⁻¹⁵ ± 1.10 ⁻¹⁵	0.9
Control sin activar	48±3 ^a	372 ± 13 ^b	2. 10 ⁻¹⁵ ± 1.10 ⁻¹⁵	1.0

^{a-c} Valores seguidos por letras iguales en la misma columna no presentan diferencias significativas ($P \geq 0.05$)

VI.2.a.2 Determinación del ángulo de contacto y propiedades de sellado

Cuando un líquido se coloca en una superficie, este puede esparcirse en la misma o formar una gota. Este comportamiento dependerá de las energías interfaciales relativas del líquido y la superficie sólida (Roach y col., 2005). Una forma conveniente para determinar este comportamiento es mediante la determinación del ángulo de contacto formado entre la interfase agua-sólido y agua-aire (Shirtcliffe y col., 2004), (Fig 23). Para superficies altamente hidrofílicas se obtienen ángulos de contacto cercanos a 0° (0-30°), mientras que las superficies hidrofóbicas presentan ángulos mayores a 90°. En este estudio, los ángulos de contacto encontrados antes (92±2°) y después (90±2°) de la activación de la película con lactocina 705 y AL705 no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P \geq 0,05$).

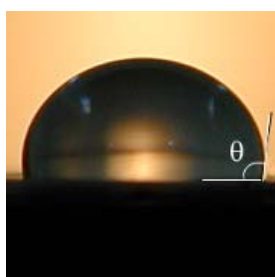


Figura 23. Imagen de una gota en una superficie de PE mostrando el ángulo de contacto (θ)

Las determinaciones de la fuerza de sellado mostraron fallas de elongación del material con delaminación y rotura de la selladura así como roturas remotas del material. Debido a que las roturas remotas se debieron a una falla en el polímero, no se tuvieron en cuenta para calcular la fuerza de sellado del mismo (ASTM F88-09). No se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en las fuerzas de sellado de la película activa ($2477 \pm 142 \text{ N m}^{-1}$) y la película sin activar ($2420 \pm 221 \text{ N m}^{-1}$).

Varios factores deben considerarse en el diseño de películas activas para aplicaciones en envases (Han, 2000). Entre las más importantes se encuentran la naturaleza físico-química del polímero, las características antimicrobianas de las sustancias y el alimento, la interacción de los componentes activos con la matriz polimérica y la migración desde el material activo (Han, 2000, Bhatti y col., 2004, Pérez-Pérez y col., 2006). Los antimicrobianos adsorbidos o inmovilizados en la superficie de polímeros podrían alterar la capacidad de sellado, adhesión y propiedades de impresión del material (Appendini y Hotchkiss, 2002). El ángulo de contacto de una superficie sirve como una medida de la capacidad de mojado, que es a su vez indicativo de la capacidad de adhesión de la superficie de la película (Nagel, 1968). En este trabajo, la capacidad de mojado de la película, determinada mediante el ángulo de contacto, y la fuerza de sellado permanecieron constantes luego del tratamiento de activación. Estos resultados sugieren que la película activada con lactocina 705 y AL705 mantiene su patrón de hidrofobicidad (ángulos de contacto $90\text{--}96^\circ$) (Porto y col., 2004; Ataefard y col., 2009). De forma similar, Mauriello y col. (2004) demostraron que la capacidad de sellado de una película de PE-OPA no se veía afectada luego de la activación con la bacteriocina anti-*Listeria* producida por *L. curvatus* 32Y. La conservación de las propiedades de sellado de un material polimérico aseguran la integridad del envase durante el almacenamiento y distribución del producto final.

Como una observación general, las sustancias proteicas se adsorben en superficies hidrofóbicas en mayor extensión que en superficies hidrofílicas (Daeschel y col., 1992). Sin

embargo, Bower y col. (1995) y Daeschel y col. (1992) encontraron mayor adsorción de nisina en superficies hidrofílicas de sílice, es decir que se obtuvieron grandes actividades de nisina en superficie con bajos ángulos de contacto. Como resultado de este estudio, la superficie hidrofóbica de PEBDL de la película multicapa T60XXB (altos ángulos de contacto) presentó actividad de lactocina 705 y AL705 y, como se mostrará en la Sección VI.2.a.4, ésta no se vio afectada por el contacto con agua. Este resultado podría sugerir que las bacteriocinas se adsorberían a través de fuerzas de interacción de tipo hidrofóbica en la superficie de la película (capa de PEBDL).

VI.2.a.3 Estabilidad antimicrobiana de la película activa

Antes de su aplicación en productos alimenticios, es importante evaluar la vida útil de la película activa. La película activa mostró diferentes actividades inhibitorias cuando se almacenó a 5, 10 y 30°C durante 45 días (Fig. 24). La actividad antimicrobiana de ambas bacteriocinas en la película se vio influenciada por el tiempo y la temperatura de almacenamiento ($P < 0.05$, GLM ANOVA). Cuando se analizó la actividad de lactocina 705 en la película, se obtuvieron inhibiciones del 32, 66 y 100% luego de 7 días de almacenamiento a 30, 10 y 5°C, respectivamente (Fig. 24a). Luego de 14 días no se detectó actividad antimicrobiana en la película almacenada a 30 y 10°C. Durante el mismo período, la película almacenada a 5°C retuvo 100% de actividad, decreciendo luego hasta el 18% (día 32 de almacenamiento). Por otro lado, la actividad anti-*Listeria* adsorbida en la película mostró efectividad inhibitoria durante períodos de tiempo más largos para las tres temperaturas evaluadas (Fig. 24b). A 30°C, la inhibición en la película disminuyó hasta el 33% (día 14), mientras que a 10°C, se observó una inhibición del 60% en el día 32. La película almacenada a 5°C retuvo una actividad inhibitoria del 69% al final del experimento (45 días).

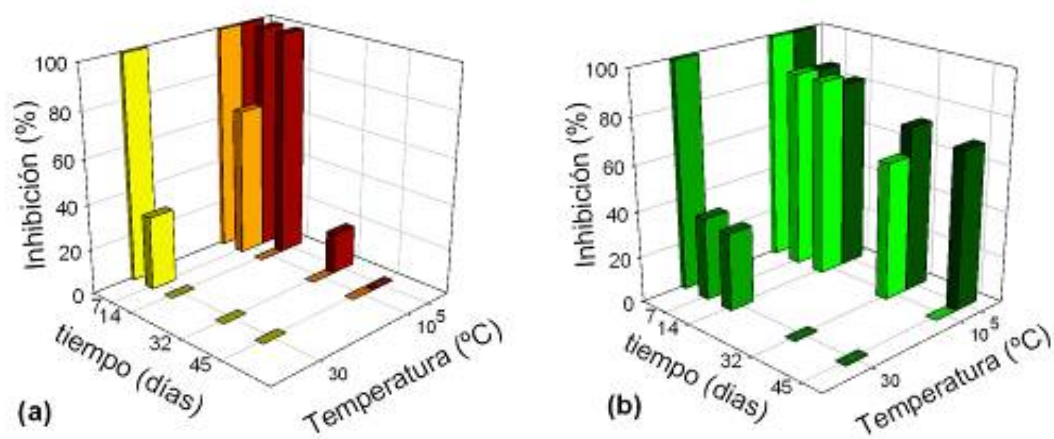


Figura 24 Actividad antimicrobiana de (a) lactocina 705 y (b) lactocin AL705 en la película almacenada (45 días) a diferentes temperaturas

Trabajos previos mostraron que las bacteriocinas producidas por BL retenían su actividad antimicrobiana cuando eran incorporadas a varios materiales y se almacenaban en diferentes condiciones (Bower y col., 1995, Ming y col., 1997, Siragusa y col., 1999). Cuando nisina fue inmovilizada en diferentes materiales poliméricos retuvo su actividad luego de 3 meses de almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Scannell y col., 2000, Neetoo y col., 2007). La bacteriocina anti-*Listeria* producida por *L. curvatus* 32Y, adsorbida en películas de PE-OPA, fue capaz de mantener su actividad antimicrobiana durante 4 meses a temperatura ambiente (Mauriello y col., 2004). En este estudio, la estabilidad antimicrobiana de la película activa disminuyó al aumentar la temperatura. La combinación óptima de condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento para asegurar la actividad de lactocina 705 y AL705 fue de 2 semanas a 5°C. En consecuencia, mientras que la solución activa (SABC 0.1%) puede almacenarse durante 2 años a -20°C sin perder su actividad (Sección IV.2.a.5), la película activa conteniendo lactocina 705 y AL705 debe prepararse unos días antes de su uso. La actividad anti-*Listeria* de la película se mantuvo durante 45 días a temperaturas de refrigeración; sin embargo, en las mismas condiciones la actividad de lactocina 705 resultó retenida durante 2 semanas. Estos resultados son prometedores para la aplicación de la película activada con lactocina 705 y AL705 en envases para

productos cárnicos listos para el consumo como salchichas tipo Bologna y tipo Vienna (Korkeala y Björkroth, 1997), susceptibles de contaminación post-procesamiento por BL y *Listeria monocytogenes*.

VI.2.a.4 Actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película activa luego del contacto con simulantes de alimentos

En la Tabla 20 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana residual en la película luego del contacto con agua y aceite de girasol, usados como simulantes de alimentos. En presencia de agua, la actividad de lactocina 705 en la película no presentó diferencias significativas ($P \geq 0.05$) respecto al control positivo de bacteriocinas. Sin embargo, luego del contacto con aceite de girasol, se observó una disminución de la actividad inhibitoria de dicha bacteriocina. Contrariamente, lactocina AL705 se mantuvo activa en la superficie de la película luego del contacto directo con agua y aceite de girasol (Tabla 20). Luego de 10 días de contacto de la película activa con agua y aceite, no se detectó actividad residual en ambos medios.

Tabla 20. Actividad antimicrobiana residual de la película activa luego del contacto directo con agua y aceite de girasol

		Áreas de inhibición relativa de	
		lactocina 705	lactocina AL705
Control positivo de bacteriocinas		0.7 ^a ± 0.4	1.8 ^a ± 0.4
Actividad antimicrobiana residual en la película	Luego del contacto con agua	0.6 ^a ± 0.2	1.5 ^a ± 0.5
	Luego del contacto con aceite	0.1 ^b ± 0.1	1.1 ^b ± 0.7

^{a-b} Las letras diferentes en cada columna señalan medias significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El polvo liofilizado conteniendo las bacteriocinas (BC) retuvo su actividad antimicrobiana (67 y 533 UA/ml para lactocina 705 y lactocina AL705, respectivamente) resuspendido en agua

cuando se almacenó 10 días a 5 °C. Debido a que el liofilizado activo no se pudo disolver en aceite, la evaluación de actividad mediante el método de difusión en agar no mostró correlación entre las áreas de inhibición y las diluciones seriadas (Datos no mostrados), en consecuencia la evaluación del título de las bacteriocinas en este medio no arrojó resultados confiables.

La investigación en tecnología de alimentos revela que la composición química y tratamiento del producto alimenticio puede tener un importante rol en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas (Zapico y col., 1999, Jung y col., 1992, Aasen y col., 2003). En este trabajo, el agua y aceite de girasol, elegidos como medio hidrofílico e hidrofóbico, se seleccionaron con el objetivo de determinar si se producía la inactivación y/o liberación de las bacteriocinas desde la película activa. Los resultados mostraron que la naturaleza fisicoquímica del medio en contacto con la película puede afectar la actividad residual de lactocina 705 y AL705 adsorbidas. La disminución en la actividad residual de lactocina 705 en la película en presencia de aceite de girasol podría estar relacionada con el modo de acción de esta bacteriocina frente a las cepas sensibles. La actividad inhibitoria de lactocina 705 depende de la interacción de dos péptidos con la membrana del microorganismo sensible en dos niveles diferentes en la bi-capa lipídica (Castellano y col., 2007). En contacto con aceite, podría sugerirse una reducida capacidad del péptido Lac705 β para interactuar con la membrana de *L. plantarum* CRL691, efecto que se traduce en una inactivación de lactocina 705 en contacto con aceite de girasol en correlación al similar efecto descrito anteriormente en presencia de ácidos grasos contenidos como impurezas en los adosrbatos C-Sac7, BC y PAL705 (Seccion V.2.d.1). Si bien se reportaron resultados similares para la actividad anti-*Listeria* de nisina y sakacina P en presencia de alimentos de alto contenido graso (Bhatti y col., 2004, Zapico y col., 1999, Jung y col., 1992, Aasen y col., 2003), en este trabajo la capacidad anti-*Listeria* de la película se mantuvo aún luego del contacto con aceite de girasol (alto contenido de grasas insaturadas).

VI.2.b Película de gluten

VI.2.b.1 Estudio de las propiedades de la película activa de gluten en función del tiempo de almacenamiento

Propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua.

Las propiedades funcionales de la película de gluten formulada con BC (0.1%) y almacenadas por 50 días (23°C, RH 50%) se determinaron periódicamente y compararon con la película de gluten sin bacteriocinas (control). El contenido de agua para la película activa y control fue del 10% durante todo el periodo de almacenamiento. En la Figura 25a y b se muestran la tensión y elongación a la rotura de las películas de gluten en función del tiempo de almacenamiento. Al principio del experimento, las propiedades mecánicas del control presentaron pequeñas diferencias respecto a las de la película activa (Fig. 25a y b) (tensión 2.0 ± 0.1 MPa y 2.7 ± 0.3 MPa; elongación a la rotura $251 \pm 14\%$ y $190 \pm 13\%$, respectivamente para el control y la película activa). Los valores obtenidos en este trabajo para las propiedades mecánicas de las películas de gluten se encuentran en el rango de los reportados para estos materiales poliméricos (Olabarrieta y col., 2006; Irissin-Mangata y col., 2001). Luego de 5 días de envejecimiento, la tensión y la elongación de la película activa alcanzaron los valores de la película control (3.5 ± 0.3 MPa y 3.4 ± 0.4 MPa; $155 \pm 21\%$ y $163 \pm 14\%$, respectivamente). Hasta el día 20 de almacenamiento, la tensión se incrementó mientras que la elongación disminuyó (3.8 ± 0.3 MPa y 3.8 ± 0.3 MPa; $137 \pm 29\%$ y $146 \pm 18\%$, respectivamente para el control y película activa), (Fig. 25a y b). A partir del día 20 y hasta el día 50 de almacenamiento, las propiedades mecánicas no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con una tensión 3.3 ± 0.3 MPa y elongación $177 \pm 29\%$ para el control, y 3.6 ± 0.2 MPa de tensión y elongación de $160 \pm 22\%$ para la película activa (Fig.25a y b). Los cambios en las propiedades mecánicas de películas de gluten como una función del tiempo fueron previamente estudiados y justificados por un aumento en la oxidación de los grupos tiol (S-H) de la proteína de gluten durante el período de envejecimiento, dando lugar a la formación de

polímeros proteicos de mayor peso molecular (entrecruzamiento) (Morel y col., 2000; Micard y col., 2000; Olabarrieta y col., 2006). La permeabilidad al vapor de agua de la película control ($8 \cdot 10^{-12} \pm 3 \cdot 10^{-13}$) no presentó diferencias significativas ($P \geq 0.05$) respecto a la película activa de gluten ($8 \cdot 10^{-12} \pm 3 \cdot 10^{-13}$), manteniéndose en el mismo orden de magnitud hasta los 50 días de almacenamiento ($8 \cdot 10^{-12} \pm 6 \cdot 10^{-13}$, $8 \cdot 10^{-12} \pm 8 \cdot 10^{-13}$, respectivamente para el control y activo). Asimismo, los valores de permeabilidad al vapor de agua encontrados en este estudio, son similares a los informados para películas de gluten obtenidas a pH ácido (Irissin-Mangata y col., 2001). El desempeño de un material de empaque debe mantenerse luego de la adición de sustancias activas, aún cuando la activación genere una formulación más heterogénea (Han, 2000). A partir de la comparación de las propiedades de la película de gluten activa y la película control, se observó que la adición de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 no afectaron significativamente las propiedades ni la cinética de envejecimiento de la película (Fig. 25).

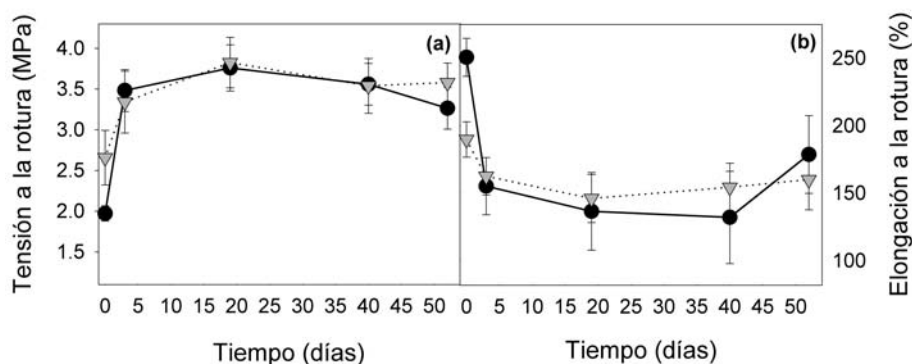


Figura 25. Propiedades mecánicas en función del tiempo para la película control (●) y activa (▼)

Tanto las propiedades mecánicas como la permeabilidad al vapor de agua de la película obtenida a partir de este recurso renovable, resultaron notablemente inferiores a las obtenidas para la película multicapa de cara interna de PEBDL, este hecho indica que el uso de las películas de gluten obtenidas en este trabajo no resultaría apropiada para la obtención de envases alimentarios.

Estabilidad antimicrobiana de la película activa

Para cumplir con el objetivo de preservar la calidad y seguridad de un alimento, los materiales antimicrobianos deben mantener sus propiedades activas durante la vida útil del alimento envasado. Se estudió la influencia del tiempo de almacenamiento (50 días a 23°C) y el envejecimiento de la película de gluten en sus propiedades antimicrobianas. Se observó una leve disminución en la actividad anti-*Listeria* (lactocina AL705) de la película de gluten al final de período de almacenamiento, mientras la disminución de la actividad de lactocina 705 en la película fue más pronunciada (Fig. 26). En coincidencia con lo encontrado para la actividad de las bacteriocinas adsorbidas en la película multicapa T60XXB (Sección VI.2.a.3; Fig. 24a y b), se observó mayor estabilidad de lactocina AL705 en la película en función del tiempo. Sin embargo, la película activa de gluten presentó actividad remanente de lactocina 705 al final del experimento, mientras que la película T60XXB perdió su actividad al final del experimento (Fig 24a comparada con Fig 26). La mayor proporción de lactocina 705 y AL705 presentes en la película de gluten, comparada con la película T60XXB, como se discutió en el Capítulo IV (Sección.2.b.2), sería la responsable de la mayor estabilidad antimicrobiana encontrada en la película de gluten respecto a la película T60XXB.

En un polímero activo, la matriz polimérica es la red interna con espacios libres en donde se ubican las moléculas del antimicrobiano. La distribución y compactamiento de las moléculas poliméricas, así como las interacciones entre los antimicrobianos y el polímero determinan el movimiento de estos aditivos a través de la red (Balasubramanian, 2012). Sebti y Coma (2002) encontraron que las interacciones electrostáticas entre la nisina (catiónica) y ácido esteárico (aniónicos) en la formulación de una película de HPMC disminuían la desorción de nisina desde la película produciendo una disminución en la actividad antimicrobiana. Sin embargo, cuando la película de HPMC se formulaba en condiciones ácidas, la nisina se liberaba desde la misma ya que se veían favorecidas las especies protonadas tanto de nisina como de ácido esteárico (Sebti y col.,

2002). Asimismo, el entrecruzamiento de películas de HPMC disminuía la actividad antimicrobiana de nisina en la matriz polimérica (Sebti y col., 2003). En este estudio, aún cuando la película de gluten sufrió envejecimiento (entrecruzamiento) durante su almacenamiento (50 días, 23°C), la actividad antimicrobiana (Fig. 26) no se vio disminuida por cambios estructurales de la película (Fig. 25a y b). Asimismo, los resultados de actividad antimicrobiana de la película de gluten son similares a los obtenidos para las bacteriocinas adsorbidas en la película T60XXB, en cuyo caso la actividad de la película estaría relacionada con la estabilidad antimicrobiana de lactocina 705 y AL705 en función del tiempo.

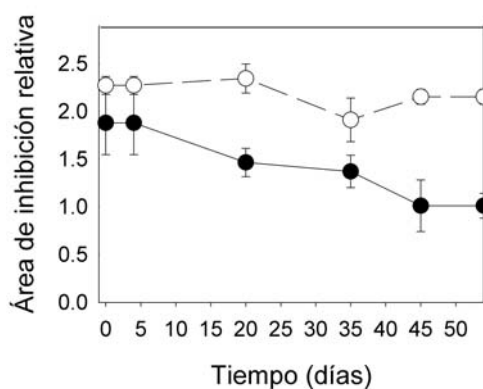


Figura 26. Actividad antimicrobiana de lactocina 705 (●) y AL705 (○) en función del tiempo. Las líneas entre puntos se utilizaron para ilustrar tendencias

Actividad residual de lactocina 705 y lactocina AL705 en la película activa luego del contacto con agua y aceite de girasol

Durante el tiempo de envejecimiento, se estudió la influencia de los medios hidrofóbico (aceite de girasol) e hidrofílico (agua) en la actividad antimicrobiana de la película de gluten, así como su actividad antimicrobiana residual luego del contacto con los medios (Fig. 27, Tabla 21). Se observó actividad residual de ambas bacteriocinas en la película de gluten aún después del contacto con agua (Fig. 27b y e); sin embargo luego del contacto con aceite solo se obtuvo

actividad antimicrobiana residual de lactocina AL705 (Fig. 27c y f). Estos resultados se obtuvieron durante todo el período de almacenamiento de la película a 23°C. Ambas bacteriocinas se detectaron en el agua que estuvo en contacto con la película al inicio del experimento, mientras que solo lactocina AL705 estuvo presente en el agua en contacto con la película luego de 15 días de envejecimiento (Tabla 21). No se detectó actividad antimicrobiana en el medio acuoso luego del contacto con una película de 30 a 50 días. Para ningún tiempo de envejecimiento se obtuvo actividad antimicrobiana en el aceite que estuvo en contacto con las películas (Tabla 21). La liberación de agentes antimicrobianos desde polímeros se encuentra influenciada por diversos factores: (i) tamaño del compuesto activo, (ii) compatibilidad del antimicrobiano con el polímero, (iii) características de la matriz polimérica, (iv) método de procesamiento, (v) composición del alimento y (vi) condiciones de almacenamiento. El entrecruzamiento de polímeros constituye una manera de manipular la red polimérica y variar el modo de liberación. Asimismo, el uso de agentes plastificantes en la obtención de estas películas poliméricas aumenta el espacio por formación de geles que son más abiertos formando redes elásticas que facilitan la liberación del antimicrobiano (Balasubramanian, 2012). En este estudio, la disminución en la liberación de bacteriocinas hacia el simulante acuoso durante el envejecimiento de la película podría estar relacionada con la reticulación de la matriz polimérica como se describió anteriormente en este Capítulo. Si bien este fenómeno entorpecería la liberación de la bacteriocina hacia el simulante a partir de los 15 días de envejecimiento de la película, la misma mantuvo su actividad antimicrobiana cuando se contactó con los microorganismos sensibles en agar semisólido (Fig. 26). Por otro lado, la falta de actividad de las bacteriocinas en el aceite de girasol luego del contacto con la película activa, coincide con la menor solubilidad de estas bacteriocinas en dicho medio como se informó en la Sección VI.2.a.4, mientras que la ausencia de actividad de lactocina 705 en la película de gluten luego del contacto con aceite es coincidente con lo observado en la película multicapa activa (Sección VI.2.a.4; Tabla 20).

Como resultado de este estudio, podría inferirse que los cambios en las propiedades de la matriz polimérica de gluten luego del envejecimiento resultarían beneficiosos, ya que se favorecería la retención del antimicrobiano en la película sin perder la actividad antimicrobiana; una película de estas características permitiría que el agente activo actúe a nivel superficial sin migrar al interior del alimento. Algunos materiales biopoliméricos (películas de papel, celulosa regenerada o celofán) son utilizados en envases para alimentos aún cuando se conocen sus pobres propiedades de barrera, en particular en condiciones de alta humedad, ya que este inconveniente se soluciona cubriendo los mismos con polímeros sintéticos (Robertson, 2008).

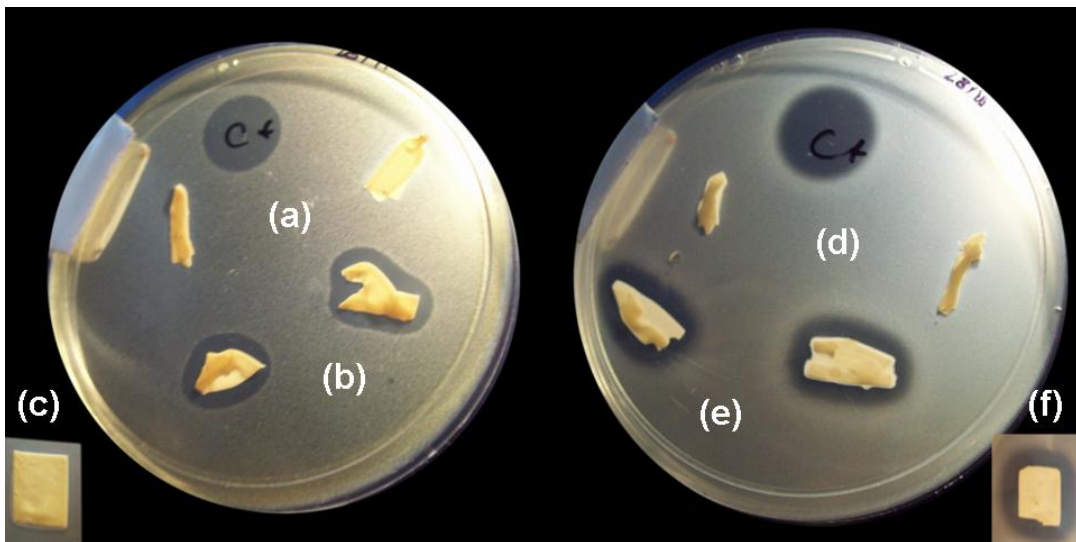


Figura 27. Actividad de lactocina 705 y AL705 en la película de gluten activa (b) y (e), respectivamente y control sin bacteriocinas (a) y (d) respectivamente, luego del contacto con agua; y aceite de girasol (c) y (f) respectivamente. (C+ corresponde a una gota de SABC)

Si bien las propiedades mecánicas y de barrera obtenidas en este trabajo para la película de gluten no resultarían apropiadas para el diseño de un envase, estas películas demostraron ser efectivas como soporte para lactocina 705 y AL705, por lo que podría sugerirse su incorporación en forma de una almohadilla colocada dentro del envase usado para el alimento.

Tabla 21. Actividad antimicrobiana residual en el agua y aceite que estuvieron en contacto con la película activa con diferentes días de envejecimiento.

Tiempo (días) de envejecimiento a 23 °C	Actividad en el medio (UA/ml) luego del contacto con la película			
	Agua		Aceite	
0	19*	122**	ND*	ND**
15	ND	32	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND
44	ND	ND	ND	ND
50	ND	ND	ND	ND

ND: no detectada; * actividad de lactocina 705; ** actividad de lactocina AL705

VI.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos señalan la importancia de conocer la estabilidad de las películas activas que deberán ser tenidos en cuenta en el almacenamiento de las películas activadas con lactocina 705 y AL705. La película multicapa demostró mayor estabilidad conservando su capacidad inhibitoria cuando se almacenó a bajas temperaturas, resultando las propiedades mecánicas y de barrera inalteradas luego de la activación. Por el contrario, la película activa de gluten podría almacenarse a mayor temperatura soportando tiempos de almacenamiento más prolongados sin perder su actividad. Además, los cambios ocurridos en la matriz polimérica de gluten (entrecruzamientos) durante el envejecimiento provocan la retención de los antimicrobianos durante 15 días, resultando este efecto beneficioso ya que la acción inhibitoria se produciría desde la superficie de la película sin migración al alimento. No obstante, sus pobres propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua sugieren que la película de gluten sea utilizada como un soporte de bacteriocinas (almohadilla) para ser incorporado en un envase formado por las películas multicapa T60XXB y T23XXB.

CAPITULO VII

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MATERIALES OBTENIDOS EN UN MODELO ALIMENTARIO (SALCHICHAS) A ESCALA PILOTO

VII.1 Introducción

A pesar de los recientes progresos en la biotecnología de los alimentos, la industria de alimentos y en particular la industria de la carne sigue siendo objeto de escrutinio por parte de los consumidores y los medios debido a los numerosos episodios sanitarios ocasionados impactaron fuertemente en la confianza de los consumidores (Bremer y col., 2005; CDC, 2002, 2007). Las condiciones de la vida moderna, algunas de ellas relacionadas o consecuencia de la globalización, propician que los factores responsables de la emergencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) estén más presentes que nunca. Sin duda, el mayor desafío para la seguridad alimentaria lo constituyen los denominados patógenos emergentes, entre los cuales se incluye a *L. monocytogenes* (Vignolo y col., 2008; 2012). La estructura industrial en la globalización se encuentra en continuo cambio y evolución debido a la necesidad de adaptación a los requerimientos de los consumidores por parte de proveedores de materia prima, productores y distribuidores de alimentos. Durante la cadena de distribución, los alimentos necesitan estar protegidos del deterioro físico, químico y microbiológico. El deterioro microbiológico de alimentos representa un problema muy significativo debido a su impacto sobre las ETAs. La vida útil del alimento es controlada por tres factores, (i) características del producto incluyendo su formulación y parámetros de procesamiento (factores intrínsecos), (ii) propiedades del envase y (iii) factores ambientales a los cuales se expone el alimento durante su distribución (factores extrínsecos).

Los factores intrínsecos incluyen el pH, presencia de gases, actividad de agua, enzimas, microorganismos y concentración de componentes reactivos (por ejemplo, antimicrobianos), pudiendo estos factores controlarse mediante la selección de la materia prima y los ingredientes así como la elección de los parámetros de procesamiento. Por otro lado, los factores extrínsecos que incluyen la temperatura, humedad relativa, presión parcial y total de gases, así como esfuerzos

mecánicos que incluyen la manipulación por parte del consumidor, podrían afectar la tasa de reacciones de deterioro que ocurren durante la vida útil del producto.

Si bien las propiedades del envase poseen un efecto significativo en muchos de los factores extrínsecos y como consecuencia indirecta, sobre las reacciones de deterioro (Robertson, 2006b), los factores intrínsecos pueden modificarse por la interacción del envase con el alimento y el ambiente exterior (Fig. 28). Aunque el espacio de cabeza en el envase (Sección I.10; Fig. 2) puede funcionar como un amortiguador entre el alimento y el material de envase, por efecto de estas interacciones el contenido de humedad (a_w), O_2 y CO_2 disueltos así como la concentración del antimicrobiano, pueden cambiar afectando la microbiota presente y la tasa de crecimiento de los microorganismos en el alimento (Lee, 2010). El crecimiento de organismos patógenos y de deterioro en los alimentos será despreciable o nulo dependiendo de la relación entre los factores intrínsecos y la temperatura. Asimismo, los factores intrínsecos del alimento y la temperatura determinarán la tasa de crecimiento de microorganismos capaces de deteriorar el producto (Fig. 28). Dependiendo del producto, proceso y condiciones de almacenamiento, la vida útil microbiológica de un alimento puede determinarse por el crecimiento de microorganismos de deterioro y/o patógenos. El método tradicional para la determinación de vida útil involucra el almacenamiento del producto a diferentes temperaturas determinando su deterioro por recuento microbiano y evaluación sensorial para el caso de los organismos de deterioro, mientras que la inoculación del alimento, almacenamiento a diferentes temperaturas y recuento es la estrategia usada en el caso de los patógenos (Robertson y col., 2006c).

El tejido muscular de animales sanos se encuentra libre de bacterias y virus patógenos, llegando estos microorganismos a la superficie de la carne durante el procesamiento y manipulación de las carcasas. Los patógenos asociados a animales pueden transferirse a la carne a partir del cuero, plumas/pelos y el tracto gastro-intestinal de los animales durante la faena, mientras que los de origen humano son transferidos por el personal durante la manipulación de

materias primas y/o productos. Tanto los patógenos asociados a humanos o animales pueden contaminar equipos, herramientas y superficies de procesamiento, los cuales inadecuadamente sanitizados pueden transformarse en vehículos de estos microorganismos (Gill y Gill, 2010).

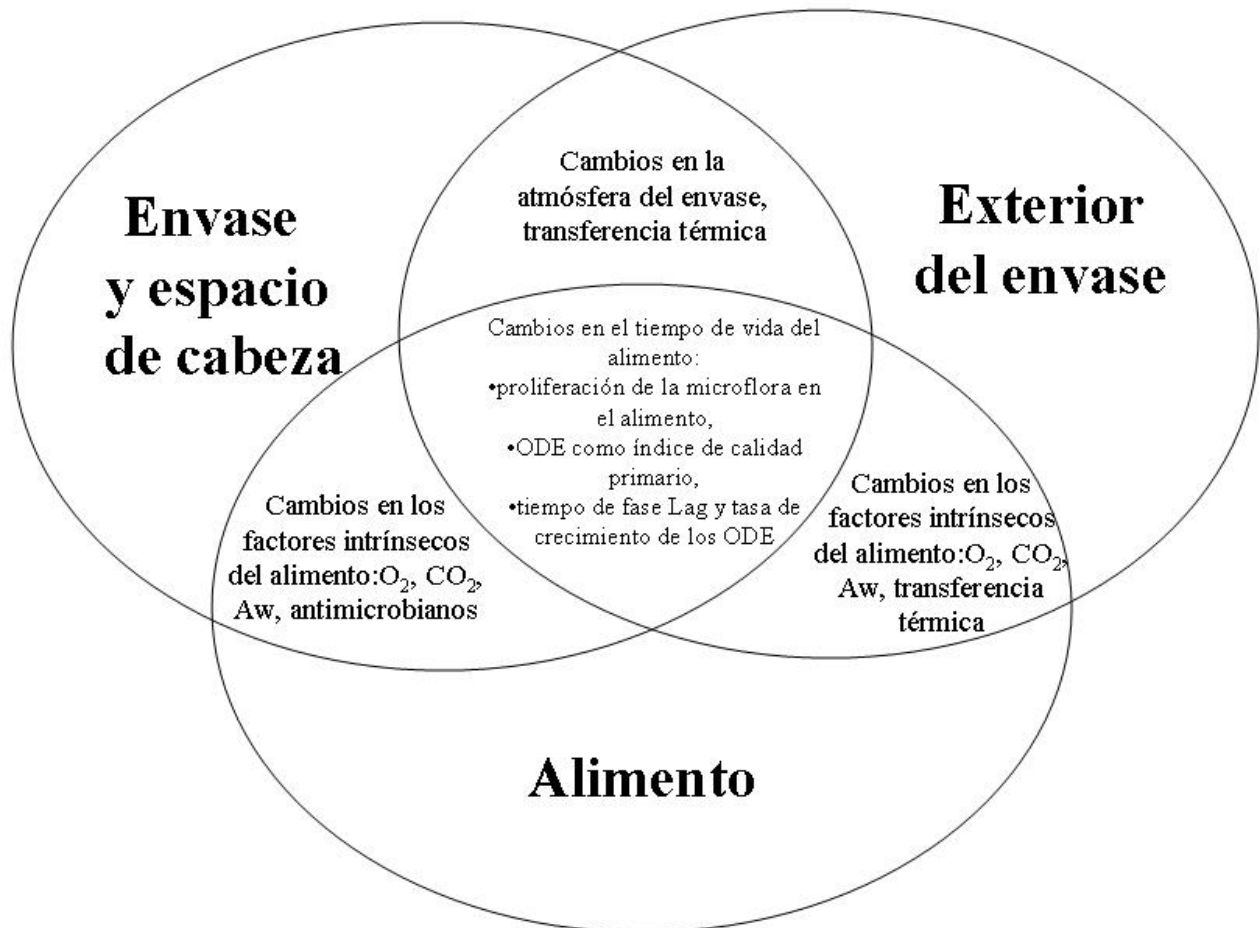


Figura 28. Interacciones alimento-envase-ambiente que afectan las características microbiológicas durante la vida útil de alimentos envasados

La mayoría de los productos perecederos son vulnerables al deterioro inclusive bajo condiciones de refrigeración. Para estos productos, su vida útil termina cuando se vuelven inaceptables debido al crecimiento de microorganismos indeseados (Lee, 2010). El punto de partida en el estudio de vida útil de un alimento es la selección de índices de calidad apropiados. Se identifica a menudo una fracción de la microflora total llamada organismos de deterioro

específicos (ODE), describiéndose a las BL presentes en productos cárnicos cocidos dentro de este grupo (Mataragas y col., 2006). Luego de determinar los ODE y el rango de condiciones en las cuales un ODE particular es responsable del deterioro, el siguiente paso en la determinación de la vida útil es determinar el número de ODE que producen el deterioro del alimento y en consecuencia la falta de aceptabilidad del mismo (Dalgaard, 1995; Koutsoumanis y Nychas, 2000). Este paso implica el conocimiento del crecimiento microbiano en función del tiempo (Fig. 29). La curva de crecimiento microbiano es un concepto bien establecido que explica la dinámica del desarrollo de los microorganismos en alimentos o medios de cultivo mediante la segmentación en las fases de latencia (lag), exponencial y estacionaria (Baranyi y Roberts, 1994). Las condiciones de almacenamiento y envasado favorables para el deterioro microbiano resultan en tiempos lag cortos y tasas de crecimiento rápidas durante la fase exponencial. La densidad celular alcanzada en la fase estacionaria de crecimiento puede aumentar con condiciones de crecimiento favorables como aumento de la temperatura, aunque a veces no cambia con las condiciones de almacenamiento (Lee, 2010).

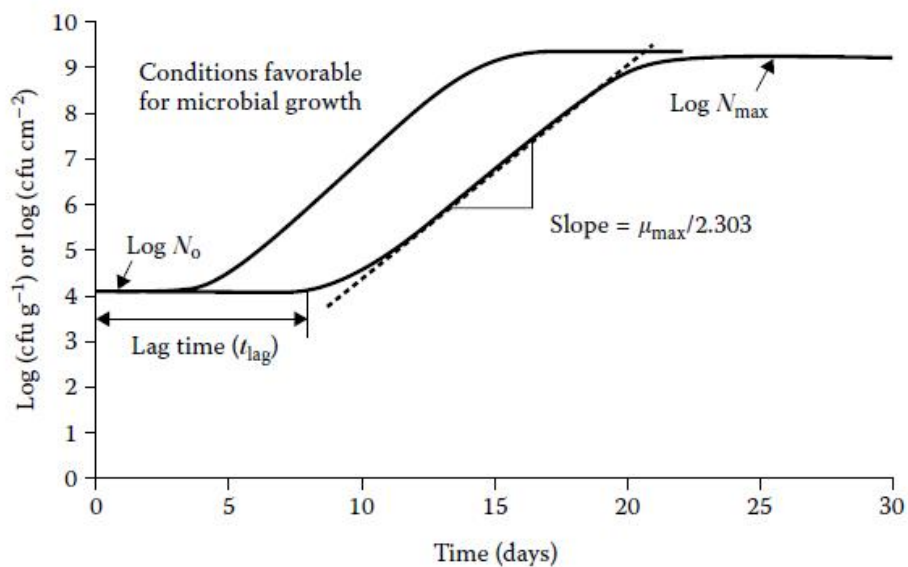


Figura 29. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana (extraída de Lee, 2010)

El límite aceptable de crecimiento microbiano que determina la vida útil difiere para los diferentes tipos de alimentos, condiciones de almacenamiento y vida útil definidas. El recuento de 10^5 – 10^8 organismos por g o cm^2 se utiliza comúnmente como límite máximo conveniente de calidad y es alcanzado generalmente durante la fase exponencial (Fig. 29). El inicio del crecimiento microbiano es usualmente indicativo de cambios en las condiciones higiénicas y sensoriales del alimento pudiendo tomarse como estimación del tiempo de vida útil. El tiempo que dura la fase lag y la tasa de crecimiento máxima específica son dependientes de las condiciones ambientales y afectan directamente el tiempo necesario para alcanzar un valor crítico de densidad microbiana correspondiente a una calidad aceptable. En consecuencia, cuando se evalúa el efecto de las condiciones de envase en la vida útil, estos dos parámetros son los más empleados para fines comparativos (Lee, 2010). El control de los factores intrínsecos combinados es utilizado para preservar la seguridad higiénica de alimentos y asegurar su calidad organoléptica, obteniendo una adecuada vida útil del alimento mediante la incorporación de bajos niveles de aditivos y la aplicación de procesos suaves de deshidratación y calentamiento (Leistner y Gould, 2002).

Considerando que un envase activo antimicrobiano es aquel capaz de inhibir el deterioro y reducir la presencia de agentes contaminantes y patógenos en los alimentos, en este Capítulo se describe la aplicación de los materiales conteniendo las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705, en el envase de salchichas tipo Viena contaminadas artificialmente con *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7, con el objeto de determinar su eficiencia antimicrobiana.

VII.2 Resultados y Discusión

VII.2.a Influencia de la luz UV en la actividad de la película multicapa

La manipulación de las películas para su activación no se realiza en esterilidad total, sin embargo la superficie activa de las películas debe permanecer estéril para no producir interferencias cuando éstas se ensayen frente a las cepas indicadoras. A los efectos de este trabajo

de Tesis, luego de la obtención de películas multicapa activas en pequeña escala, se realizaron lavados con agua estéril a fin de eliminar las contaminaciones superficiales de la película (Sección II.8.a.1). En cambio, para experimentos a escala piloto y con fines prácticos, la película se expuso a la luz UV como tratamiento de esterilización post-activación. Para determinar si la exposición a la luz UV (10 min) influía en la actividad de las películas T60XXB y T73XXB, se compararon las áreas de inhibición de las películas activas luego de la esterilización UV, con aquellas de las películas producidas por contacto. Se observó que el tratamiento post-activación con UV no ejercía influencia alguna ($P \geq 0.05$) en la actividad antimicrobiana de las películas (Tabla 22).

Tabla 22. Influencia de los tratamientos post-activación en la actividad antimicrobiana de las películas multicapa.

Película	Tratamiento luego de la activación	Área de inhibición relativa	
		lactocina 705	lactocina AL705
T60XXB	Lavado con agua y secado (10 min 50 ° C)	0,9±0,3	1,9 ± 0,2
T60XXB	Exposición a la luz UV (10 min)	0,8±0,2	1,7±0,3
T73XXB		0,7±0,4	1,7±0,4

VII.2.b Análisis microbiológico y visual, determinación del pH de paquetes de salchichas inoculados con *Lactobacillus plantarum* CRL 691 y *Listeria innocua* 7

Las salchichas inoculadas por separado con *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7, se colocaron en envases formados por las películas multicapa (T60XXB y T73XXB) activadas (conteniendo las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705), las mismas películas sin activar y envases multicapa sin activar conteniendo una almohadilla de gluten activado y una almohadilla sin activar. También se incluyeron controles de salchichas sin inocular envasadas con las películas sin activar. Los paquetes sin bacteriocinas mostraron el crecimiento típico de ambos

organismos inoculados (Fig. 30 y 31, respectivamente para los paquetes multicapa y los que contenían la almohadilla de gluten), alcanzando los mismos un máximo de alrededor de 10^7 UFC/g a los 45 días de almacenamiento a 5°C . El recuento de mesófilos totales en salchichas no inoculadas alcanzó un valor de 1×10^2 UFC/g para el paquete multicapa y 4×10^2 UFC/g para el paquete conteniendo la almohadilla de gluten sin bacteriocinas (día 45 de almacenamiento) (dato no mostrado). En paquetes activados (tanto el multicapa como el que contenía la almohadilla de gluten) se observó un efecto bacteriostático sobre *L. innocua* 7 durante las primeras 4 semanas de almacenamiento a 5°C , presentando luego una leve disminución en el recuento ($P < 0.05$, Figura 31 y 32). La tasa de crecimiento máxima específica fue de -0.0003 y -0.0002 h^{-1} , para los paquetes multicapa activo y el que contenía la almohadilla de gluten activa, respectivamente. A los 45 días de almacenamiento a 5°C , *L. innocua* 7 evaluada en los paquetes activos se mantuvo 2.5 unidades logarítmicas por debajo de los respectivos controles sin bacteriocinas (Fig. 30 y 31).

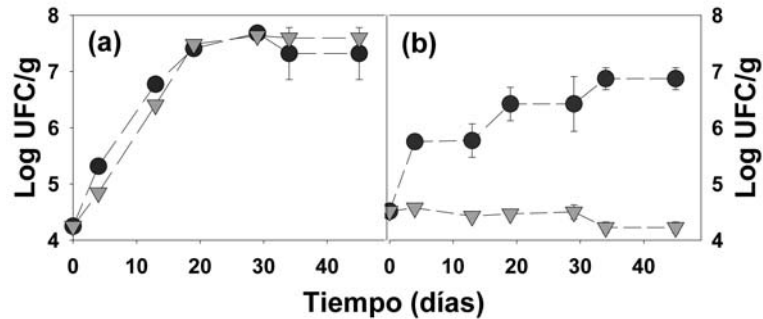


Figura 30. Crecimiento de *L. plantarum* CRL691(a) y *L. innocua* 7 (b) en función del tiempo (45 días a 5°C) en paquetes activos (▼) y controles (●) formados por las películas multicapa

La contaminación post-cocción representa un motivo de preocupación en la seguridad alimentaria de productos cárnicos cocidos. Este tipo de contaminación ocurre típicamente en la superficie del alimento por exposición al aire, contacto con el equipamiento y trabajadores (Korkeala y Björkroth, 1997). Los resultados de este estudio están de acuerdo con la inhibición de *Listeria* reportada usando otros materiales de empaque (PE, PE/PA, LDPE, e insertos de matrices celulósicas), conteniendo bacteriocinas (lacticina 3147, nisina, enterocina 416K1, bacteriocina

producida por *L. curvatus* 32Y) inmovilizadas (Scannell y col., 2000, Mauriello y col., 2004; Iseppi y col., 2008). La tendencia en el crecimiento de *Listeria* en los paquetes activos inoculados depende de dos fenómenos opuestos: (i) la tasa de crecimiento de la bacteria, relacionada principalmente con el tipo de alimento considerado y la temperatura de almacenamiento, y (ii) la tasa de muerte debida a la actividad antimicrobiana de la bacteriocina y su velocidad de difusión desde el material polimérico (Iseppi y col., 2008). Es esencial que los agentes preservantes tengan baja difusividad a través del film y se mantengan en la superficie del alimento ya que su difusión en la matriz del alimento resultaría en una reducción de la concentración del preservante en la superficie (Scannell y col., 2000). Resultados reportados por Iseppi y col. (2008) dan cuenta de la disminución en la actividad antimicrobiana frente a *Listeria* en función del tiempo para una película de PEBD recubierta con enterocina 416K1 usada como envase de salchichas; siendo la pérdida de actividad adjudicada a la mayor velocidad de difusión de la bacteriocina desde la capa del recubrimiento en contacto con el alimento, mientras que la velocidad disminuía en capas más profundas. En este estudio, la inhibición de *L. innocua* 7 observada en paquetes activos respecto a los controles durante 45 días de almacenamiento, indicaría una liberación del antimicrobiano a mayor velocidad que la del crecimiento de *L. innocua* 7, alcanzándose en la superficie del alimento una concentración de lactocina AL705 constante, que a su vez sería mayor o igual a la MIC durante todo el experimento.

La vida útil (o vida de estante) de un alimento representa el período de tiempo durante el cual las características de calidad específicas del mismo se mantienen inalteradas, en la estantería del distribuidor y el consumidor, antes de resultar inaceptable (Robertson, 2006d). El recuento de BL se ha usado como criterio para la determinación de vida útil de productos cárnicos cocidos, carnes y vegetales envasados al vacío y atmósferas modificadas (Lee, 2010). En este trabajo, la presencia de lactocina 705 provocó un ligero retardo en el crecimiento (0.5 unidades logarítmicas) de *L. plantarum* CRL691 inoculado en paquetes multicapa durante las dos primeras semanas de

almacenamiento, alcanzando los paquetes activo y control, el mismo recuento (7,5 log UFC/g) a los 19 días de almacenamiento a 5°C (Fig. 30). Asimismo, se obtuvo una leve disminución en la tasa de crecimiento máxima específica para *L. plantarum* CRL691 en el envase activo (μ_{\max} = 0.008 y μ_{\max} = 0.007 h⁻¹ respectivamente, para el control y activo, Fig 30).

Por otro lado, en aquellos paquetes conteniendo la almohadilla activa de gluten, el efecto inhibitorio de lactocina 705 fue ligeramente mayor al encontrado para el paquete multicapa. Se observó un leve retardo de la fase lag de *L. plantarum* CRL691 respecto al control (85 h y 193 h respectivamente para el control y activo, Fig. 31), con la consiguiente reducción (0.5 unidades en el día 19) en el crecimiento respecto al control, alcanzando luego ambos paquetes (activo y control) el mismo crecimiento a los 35 días de almacenamiento a 5 °C. La tasa de crecimiento obtenida en los paquetes conteniendo la almohadilla de gluten (μ_{\max} = 0.02 y μ_{\max} = 0.01 h⁻¹, respectivamente para el activo y control, Fig. 31) resultó mayor que la obtenida en los paquetes multicapa. Este resultado sugiere la utilización de componentes de la película de gluten como fuente de nutrientes por parte de *L. plantarum* CRL691.

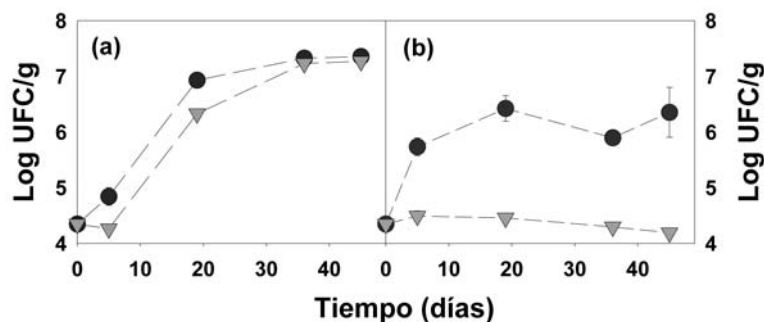


Figura 31. Crecimiento de *L. plantarum* CRL691 (a) y *L. innocua* 7 (b) en función del tiempo (45 días a 5°C) en paquetes activos (▼) y controles (●) formados por las películas multicapa conteniendo películas de gluten

Si bien en medios de cultivos, tanto lactocina 705 como AL705 demostraron un modo de acción bactericida sobre *L. plantarum* CRL691 y *Listeria* (Vignolo y col., 1996a, 2000; Castellano y col., 2004), el efecto bacteriostático observado en carne o productos cárnicos (Vignolo y col.,

1996b; Castellano y Vignolo, 2006) es debido a la presencia de diferentes factores presentes en la carne (enzimas endógenas y grasa, entre otros) que producirían la degradación de las bacteriocinas (péptidos) así como la unión de la misma a partículas de grasa, con la consiguiente disminución de su actividad antimicrobiana (Castellano y col. 2008). En el presente estudio, la actividad antimicrobiana de lactocina 705 adsorbida en la película de gluten mostró ser afectada por la presencia de un medio hidrofóbico (aceite de girasol, Sección VI.2.a.4 y VI.2.b.1) por lo cual podría inferirse que la grasa presente en las salchichas (20-30% de la emulsión cárnica) afectaría negativamente la actividad de lactocina 705, disminuyendo su capacidad de inhibición. Este hecho refleja el elevado impacto de la matriz del alimento en la efectividad de tecnologías post-proceso, resaltando la importancia de validar la actividad antimicrobiana en cada aplicación particular (Gálvez col., 2007; Marcos y col., 2013).

La determinación del pH de las salchichas en los paquetes inoculados con *L. plantarum* CRL691, mostró una disminución desde 6.3 hasta 5.9 (día 19), manteniéndose luego su valor en las proximidades de 5.8 a partir de los 30 días hasta el final del experimento (Fig. 32a y b). En el caso de los paquetes inoculados con *L. innocua* 7 y aquellos sin inocular, el valor del pH fue de 6.3 durante todo el experimento.

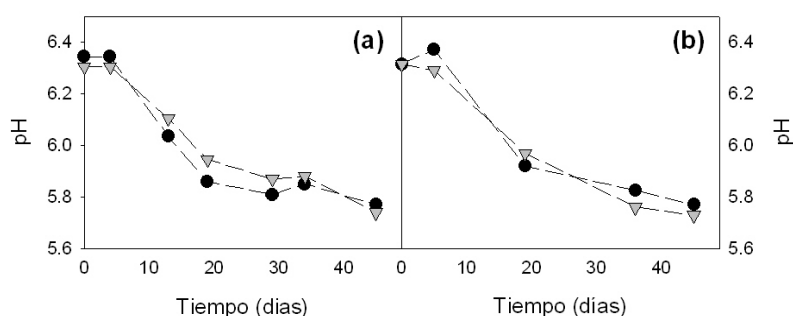


Figura 32. Variación del pH en función del tiempo (45 días a 5 ° C) en paquetes de salchichas inoculadas con *L. plantarum* CRL691 activo (▼) y control (●) formados por las películas multicapa (a), y paquetes conteniendo una almohadilla de gluten (b)

El descenso en el valor de pH en los paquetes inoculados con *L. plantarum* CRL691 está en coincidencia con la elevada capacidad acidogénica de esta especie determinada en trabajos previos (Fadda y col., 2010). Por otra parte, la inspección visual de los paquetes de salchichas envasadas con ambas películas activadas evidenció la presencia de burbujas en el exudado a partir del día 19 de almacenamiento a 5°C, tanto en los paquetes inoculados (activo y sin bacteriocinas) como en los paquetes sin inocular (Fig. 33). A pesar del carácter heterofermentativo facultativo de *L. plantarum* CRL691, no podría asegurarse que la producción de CO₂ sea una consecuencia del metabolismo de este microorganismo.



Figura 33. Presencia de burbujas en los paquetes de salchichas luego de 19 días de almacenamiento a 5°C

La producción de gas en productos cárnicos como las salchichas puede deberse los subproductos generados en el metabolismo heterofermentativo de otras BL contaminantes como *Lactobacillus* y *Leuconostocs* presentes en la emulsión cárnica (Korkeala y Björkroth, 1997; Mataragas y col., 2006). Estos géneros de BL son también capaces de crecer en el medio MRS, utilizado para la cuantificación de *L. plantarum* CRL691 en este estudio. La probabilidad de

contaminación con microorganismos productores de gas durante la manipulación para el termosellado al vacío de los paquetes conteniendo salchichas (procedimiento realizado en condiciones no estériles), podría explicar la aparición de las burbujas en este estudio (Fig. 33).

VII.2.c Determinación de la actividad residual de las bacteriocinas

Luego de estar en contacto con las salchichas durante todo el experimento, tanto las películas multicapa activas (T60XXB y T73XXB) como el exudado de las salchichas dentro del paquete no exhibieron actividad residual para ninguna de las bacteriocinas (Fig. 34a y b).

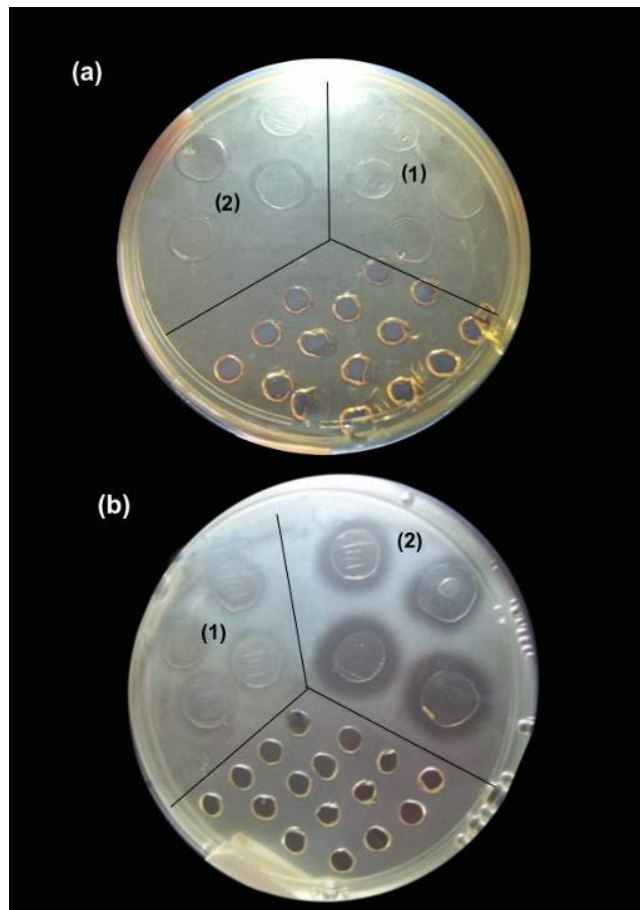


Figura 34. Actividad residual de (a) lactocina 705 y (b) AL705 en las películas activas T60XXB y T73XXB en contacto (1) y sin contacto con las salchichas (2). Los pocillos en las placas de Petri corresponden al análisis de actividad en el exudado de salchichas

Por su lado, las almohadillas de gluten activas y el exudado de las salchichas, si bien no exhibieron actividad residual para lactocina 705 (Fig. 35a), mostraron actividad antimicrobiana

residual para lactocina AL705 (bacteriocina anti-*Listeria*) durante 15 días de almacenamiento a 5°C (Fig. 35b).

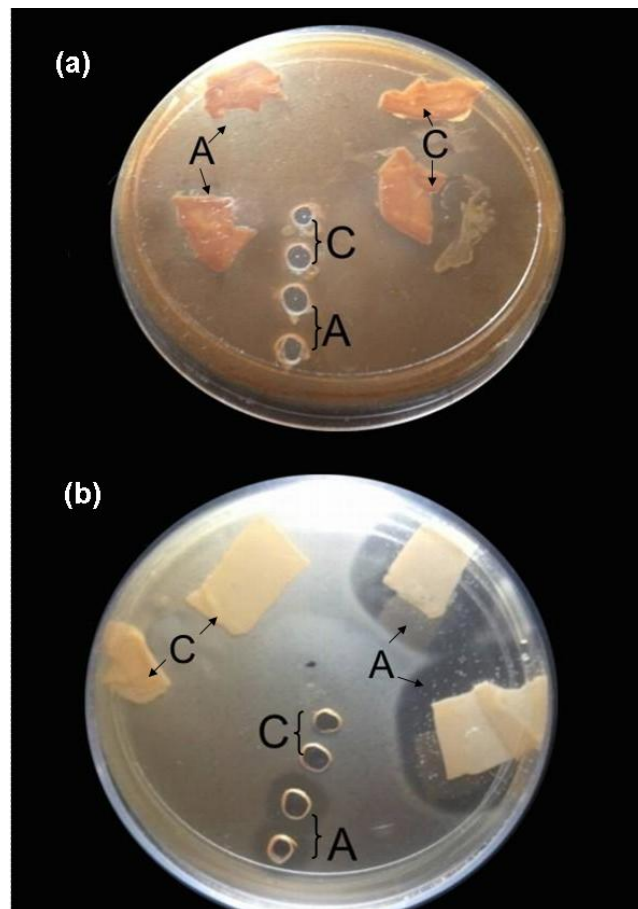


Figura 35. Actividad residual de (a) lactocina 705 y (b) AL705 en la película activa (A) y el control sin bacteriocinas (C) luego del contacto con las salchichas (15 días a 5°C). Los pocillos en las placas de Petri corresponden al análisis de actividad en el exudado de salchichas

La actividad residual de lactocina AL705 en la película de gluten (y ausente en la película multicapa) luego del contacto con las salchichas, denotaría la presencia de esta bacteriocina en mayor concentración en la película de gluten que en las películas multicapa. Este hecho estaría de acuerdo con lo discutido anteriormente (Capítulos IV y VI). Por otra parte, la ausencia de actividad residual de lactocina 705 en todas las películas luego del contacto con las salchichas, podría explicarse por la interferencia del contenido graso de las mismas con la actividad antimicrobiana en ambas películas (multicapa y gluten) ensayadas.

VII. 3 Conclusiones

Las dos películas activas desarrolladas en este estudio, tanto las obtenidas a partir de polímeros multicapa comerciales, como a partir de un polímero proteico (gluten de trigo) mostraron elevada eficiencia anti-*Listeria* en el modelo alimentario ensayado (salchichas tipo Viena). La inhibición de *L. plantarum* CRL691 (usado como contaminante de deterioro) se vio dificultada por la inactivación de lactocina 705 en presencia del alto porcentaje de grasa en la composición del alimento. Estos resultados demuestran la importancia del diseño del envase activo para cada alimento en particular.

CONCLUSIONES FINALES

- Las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705 (lactocina 705 y lactocina AL705) retienen su actividad antimicrobiana cuando se encuentran adsorbidas en la superficie de películas multicapa (cara interna de PEBDL) y cuando son incluidas en una matriz polimérica de gluten.
- Se establecieron las condiciones para la obtención de la película multicapa (T60XXB) conteniendo lactocina 705 y lactocina AL705. La película se activó por contacto (1 hora a 30°C) con la solución de bacteriocinas obtenida a partir de *L. curvatus* CRL705 (SABC 0,1%, AIM: 267 UA/ml para lactocina 705 y 2133 UA/ml para AL705). La película multicapa conteniendo las bacteriocinas presentó mayor actividad anti-*Listeria* que la misma película tratada con nisina (a valores iniciales equivalentes de UA/ml).
- Se observó retención de la actividad antimicrobiana en la película T60XXB aún luego del contacto con agua (10 días a 5°C), sugiriendo que las bacteriocinas estarían adsorbidas en la superficie de la cara interna de PEBDL mediante interacciones de tipo hidrofóbicas.
- El contacto con un medio hidrofóbico (aceite de girasol) no alteró la actividad de lactocina AL705 en la película, mientras que lactocina 705 resultó inactivada. El modo de acción de lactocina 705 frente al microorganismo indicador sería responsable de este efecto, por la reducida capacidad del péptido Lac705 β (componente de la bacteriocina) para interactuar con la membrana de *L. plantarum* CRL691 en contacto con el simulante graso.
- La película multicapa activada con lactocina 705 y AL705 mantuvo su aptitud (propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y propiedades de sellado) para su uso como material de envases. La película activa mostró estabilidad en sus propiedades anti-*Listeria* cuando fue almacenada a 5 °C.
- La adsorción de las bacteriocinas en la superficie de PEBDL de la película multicapa (T60XXB) mostró concentraciones de saturación para lactocina 705 y AL705 de 1600 UA/ml y

300 UA/ml, respectivamente. La AIM obtenida para la solución de activación SABC 0.1% (267 UA/ml para 705 y 2133 UA/ml para AL705) indica que dicha concertación se encontraría por debajo del punto de saturación de lactocina 705 en la película y por encima para lactocina AL705. La presencia de impurezas (metabolitos de la cepa productora y del medio de cultivo) afectaron la adsorción de lactocina 705 en la película multicapa, no detectándose este efecto en la adsorción de lactocina AL705.

- Se obtuvo una película activa de gluten por inclusión de SABC 0.1% en la formulación.
- Debido a la gran estabilidad antimicrobiana presentada por la película de gluten y sus deficientes propiedades mecánicas y de permeabilidad, se propuso su uso como soporte de bacteriocinas en forma de almohadilla para su inclusión en un envase conformado por las películas multicapa sintéticas (T60XXB y T73XXB).
- Se observó actividad anti-*Listeria* en salchichas inoculadas con *L. innocua* 7 cuando éstas fueron colocadas en los envases activos obtenidos, mientras que la inhibición de *L. plantarum* CRL691 (como organismo deteriorante) se vio dificultada por la inactivación de lactocina 705 en presencia de elevado contenido de grasa en la composición del alimento (20-30%).
- Si bien nisina es la única bacteriocina aprobada como aditivo alimentario hasta el momento, la investigación de otros antimicrobianos como biopreservantes y su potencial aprobación constituyen un gran aporte para la seguridad alimentaria.
- Teniendo en cuenta que la preservación mediante agentes biológicos no sustituye las buenas prácticas de manufactura, las excelentes propiedades de retención de las bacteriocinas en las matrices ensayadas en esta Tesis muestran el gran potencial de aplicación de estos polímeros activos. En particular, el desarrollo de películas a partir de residuos agroindustriales constituye un gran avance hacia la disminución de residuos no biodegradables.

PROYECCIONES

Se propone evaluar:

- La eficiencia antimicrobiana de las películas obtenidas en alimentos de menor contenido graso.
- El efecto de la combinación de lactocina AL705 y nisina y su efectividad antimicrobiana en salchichas
- Estudios complementarios por dicroísmo circular de la adsorción de lactocina 705 y AL705 en la película multicapa para evaluar cambios conformacionales sugeridos en este estudio de Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos dieron lugar a los siguientes artículos científicos:

2013 Active polymers incorporated with *L. curvatus* CRL705 bacteriocins: effectiveness assesment in Wieners. Blanco Massani M., Molina V., Sanchez M., Renaud V., Eisenberg P. y Vignolo G. *Aguardando desición de la revista*

2013 Development of a wheat gluten film with *L. curvatus* CRL705 bacteriocins and antimicrobial performance study during aging. Blanco Massani Mariana, Botana Adrián, Eisenberg Patricia y Vignolo Graciela. *Aguardando desición de la revista*

2013 Adsorption of the bacteriocins produced by *Lactobacillus curvatus* CRL705 on a multilayer-LLDPE film for food-packaging applications. Blanco Massani, Pedro J Morando, Graciela M Vignolo y Patricia Eisenberg. *LWT - Food Science and Technology*. **53**, 128-138.

2012 Characterization of a multilayer film activated with *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. Blanco Massani, Pedro J Morando, Graciela M Vignolo and Patricia Eisenberg. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**, 1318-1323.

2008 Development and characterization of an active polyethylene film containing *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins. Blanco Massani, Mariana, Fernandez, María Raquel, Ariosti, Alejandro, Eisenberg, Patricia and Vignolo, Graciela. *Food Additives and Contaminants* **11**, 1424-1430.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, I.M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., and Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int J Food Microbiol*, **87**, 35-43.
- Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eisink, V.G., and Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-pwptide bacteriocins, plantaricin EF and IK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ Microbiol*, **64**, 2269-2272.
- Andrade, J.D., and Hlady, V. (1986). Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses. *Adv Polym Sci*, **79**, 1-63.
- Appendini, P., and Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innov Food Sci Emerg Technol*, **3**, 113-126.
- Aso, Y., Takeda, A., Sato, M., Takahashi, T., Yamamoto, T., and Yoshikiyo, K. (2008). Characterization of lactic acid bacteria coexisting with a nisin Z producer in Tsuda-turnip pickles. *Curr Microbiol*, **57**, 89-94.
- ASTM D 638-07 (2007). Standard test method for tensile properties of plastics. Philadelphia, USA. American Society for Testing and Materials.
- ASTM E 96/E 96 M-05 (2005). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Philadelphia, USA. American Society for Testing and Materials.
- ASTM F 88/F88M-09 (2009). Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials. Philadelphia, USA. American Society for Testing and Materials.
- Ataeefard, M., Moradiana, S., Mirabedinib, M., Ebrahimia, M. and Asiabanc, S. (2009). Investigating the effect of power/time in the wettability of Ar and O₂ gas plasma-treated low-density polyethylene. *Prog Org Coat*, **64**, 482-488.
- Athamneh, A.I., Griffin, M., Whaley, M., and Barone, J.R. (2008). Conformational Changes and Molecular Mobility in Plasticized Proteins. *Biomacromolecules*, **9**, 3181-3187.
- Balasubramanian, A. (2012). Predicting target release profile of antimicrobials from controlled release packaging. Disponible en: <http://mss3.libraries.rutgers.edu/dlr/showfed.php?pid=rutgers-lib:37363>. [acceso 21/06/2012]
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol*, **23**, 277-294.
- Barth, A. (2000). The infrared absorption of amino acid side chains. Review. *Progr Biophys Mol Biol*, **74**, 141-173.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., and Sablani, S.S. (2011) Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging. *Food Eng Rev*, **3**, 79-93.
- Bastos, M.C.F., Coutinho, B.G., and Coelho, M.L.V. (2010) Lysostaphin: A Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, **3**, 1139-1161.
- Belcher, J.N. (2006). Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Sci*, **74**, 143-148.

- Berjeaud, J-M and Cenatiempo, Y. (2004). Purification of antilisterial bacteriocins. *In: Methods in Molecular Biology*. Spencer JFT, Ragout de Spencer AL, (eds). pp. 225–233, Chapter 21. Totowa, NJ: Humana Press.
- Bhatti, M., Veeramachaneni, A. and Shelef, L.A. (2004). Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int J Food Microbiol*, **97**, 215–219.
- Bierbaum, G. and Sahl, H.-G. (2009) Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**, 2-18.
- Bizani, D., Dominguez, A.P.M. and Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Lett Appl Microbiol*. **41**, 269-273.
- Boletín epidemiológico anual 2010. Ministerio de Salud de la Nación. pp 1-88. [www.msal.gov.ar](http://msal.gov.ar)
 Disponible en: http://msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/bep-anual-2010/BEPANUAL_2010.pdf. [acceso 10/05/2012]
- Borch, E. , Kant-Muermans, M-L., and Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol*, **33**, 103–120.
- Bourtoom, T. (2008) Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int Food Res J*, **15**, 237-248.
- Bower, C.K., McGuire, J. and Daeschel, M.A. (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 992–997.
- Bower, C.K., Bothwell, M.K., and McGuire, J. (2001) Review Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **22**, 259–265.
- Bower, C.K., Parker, J.E., Higgins, A.Z., Oest, M.E., Wilson, J.T., Valentine, B.A., Bothwell, M.K., and McGuire, J. (2002) Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **25**, 81–90.
- Bremer, V., Bocter, N., Rehmet, S., Klein, G., Breuer, T., and Ammon, A. (2005). Consumption, knowledge, and handling of raw meat: A representative cross-sectional survey in Germany, March 2001. *J Food Protect*, **68**, 785–789.
- Brody, A.L. (1997). Packaging of food. *In: The Wiley encyclopedia of packaging* (2nd ed.), Brody, A. L. and Marsh, K.S. (eds). pp 699–704. John Wiley and Sons, Inc, New York, USA,
- BS EN 1186–7 (2002) Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics. Part 7: Test methods for overall migration into aqueous food simulants using a pouch. London: British Standards Institute.
- Buonocore, G.G., Del Nobile, M.A., Panizza, A., Corbo, M.R. and Nicolais, L. (2003). A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. *J Control Release*, **90**, 97–107.
- Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., La Notte, E., and Del Nobile, M.A. (2004). Controlled release of antimicrobial compounds from highly swellable polymers. *J Food Protect*, **67**, 1190-1194.
- Burianek, L. and Yousef, AE. (2000). Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett Appl Microbiol*, **31**, 193-197.

- Cabo M.L., Murado M.A., González M.P. and Pastoriza L. (1999) A method for bacteriocin quantification. *J Appl Microbiol*, **87**, 907-914.
- Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E.T. (2002) Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. *J Food Technol*, **67**, 2317–2324.
- Cagri, A., Ustunol, Z. and Ryser, E.T. (2004) Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot*, **67**, 833-848.
- Callewaert, R. and De Vuyst, L. (1999). Expanded bed adsorption as a unique operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation*, **8**, 159-168.
- Castellano, P., Farías, M.E., Holzapfel, W., and Vignolo, G. (2001) Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins lactocina 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnol Lett*, **23**, 605-608.
- Castellano, P., Raya, R., and Vignolo, G. (2003). Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *Int J Food Microbiol*, **85**, 35-43.
- Castellano, P., Holzapfel, W., and Vignolo, G. (2004). The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *Food Microbiol*, **21**, 291-298.
- Castellano, P. (2005) Bacteriocinas de bacterias lacticas como biconservadores en carne envasada de atmosfera modificadas. Estrategias de aplicación. [Tesis doctoral]. San Miguel de Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, pp. 60-61.
- Castellano, P., and Vignolo, G. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by the addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Lett Appl Microbiol*. **43**, 194-199.
- Castellano, P., Vignolo, G., Farías, R.N., Arrondo, J.L., and Cheín, R. (2007). Molecular view by Fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between lactocin 705 and membranes: Speculations on antimicrobial mechanism. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 415-420.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., and Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci*. **79**, 483-499.
- Castellano, P.H., González, C., Carduza, F., and Vignolo, G. (2010) Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Sci*, **85**, 394 - 401
- Cayré, M.E. , Garro, O., and Vignolo, G. (2005) Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiol*, **22**, 505-512.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2007) Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States, 2006. *MMWR Morb. Mort. Wkly Rep*. **56**, 336-339.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009. From The Centers For Disease Control And Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection With Pathogens Transmitted Commonly Through Food—10 States, 2008. *The Journal of American Medical Association*, **301**, 2088-2090.

- Cha, D.S. and Chinnan, M.S. (2004) Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **44**, 223-237.
- Chen, Y., Ross, W.H., Scott, V.N. and Gombas, D.E. (2003) *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J Food Protection*, **66**, 570-577.
- Cho, S.Y., Lee, D.S., and Han, J.H. (2009) Antimicrobial Packaging. In: *The Wiley encyclopedia of Packaging Technology*. Kit L.Yam (eds.), pp. 50-59. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Chung, D., Papadakis, S.E. and Yam, K.L (2003) Evaluation of a polymer coating containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging materials. *Int J Food Sci Technol*, **38**, 165–169.
- Church, D. (2004). Major factors affecting the emergence and re-emergence of infectious diseases. *Clin Lab Med*, **24**,559–586.
- Cocolin L., Dolci P., Rantsiou K., Urso R., Cantoni C., and Comi G. (2009) Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Sci*, **82**, 125–132.
- Código Alimentario Argentino. Artículo 349 Capítulo VI: Alimentos carneos y afines, p 25.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci*, **78**, 90-103.
- Comi G., Urso R., Iacumin L., Rantsiou K., Cattaneo P., Cantoni C., and Cocolin L. (2005) Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci*, **69**, 381–392.
- COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union. L 338/1-26.
- Conte, A., Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., and Del Nobile, M.A. (2004) Development of immobilized lysozyme based active film. *J Food Eng*, **78**, 741-745.
- Cooksey, K. (2005) Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Addit Contam*, **22**, 980-987.
- Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev*, **3**, 777-788.
- Coventry, M.J., Gordon, J.B., Alexander, M., Hickey, M.W., and Wan, J. (1996). A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 1764-1769.
- Cuozzo, S.A., Sesma, F., Palacios, J.M., Pesce de Ruiz Holgado, A. and Raya, R.R. (2000). Identification and nucleotide sequence of genes involved in the synthesis of lactocin 705, a two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *FEMS Microbiol Lett*, **185**, 157-161.
- Cuozzo, S, Sesma, F, Ruiz Holgado, AP and Raya, R (2001). Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In: *Methods in Biotechnology*. Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer A.L., (eds). pp. 141-146, Chapter 18. Humana Press, Totowa, NJ
- Cuozzo, S.A. (2002) [Tesis Doctoral] Estudio genético de Lactocina 705, una bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* CRL 705. Universidad Nacional de Tucuman, pp 14-26.

- Cuozzo, S., Castellano, P., Sesma, F., Vignolo, G. and Raya, R. (2003). Differential roles of the two-component peptides of Lactocin 705 in antimicrobial activity. *Curr Microbiol*, **46**, 180–183.
- Cutter, C.N. (1999) The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *J Food Prot*, **62**, 474–479.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. (1994). Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiol*, **11**, 481-489.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. (1996). Reductions of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. *Food Microbiol*, **13**, 23-33.
- Cutter, C.N., Willett, J.L., and Siragusa, G.R. (2001). Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. *Lett Appl Microbiol*, **33**, 325–328.
- Daeschel, M.A., McGuire, J.M., and Al-Makhlafi, H. (1992). Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *J Food Protect*, **55**, 731–735.
- Dalgaard, P. (1995) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int J Food Microbiol*, **26**, 305-317.
- Day, B.P.F. (2008) Active Packaging of Food. *In: Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods*. Kerry, J. and Butler, P. (eds), pp. 1-18, Chapter 1. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- De Nicola, M., and Valdivia, F. (2006) Seguridad alimentaria: un binomio redituable. *ISALUD. Publ.del Inst. Universitario ISALUD*, **1**, 10-12
- De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194-199.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Buonocore, G.G., Incoronato, A.L., Massaro, A., and Panza, O. (2009). Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *J Food Eng*, **93**, 1-6.
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D.R., Añón, M.C., Sobral, P.J.A., Mauri, A.N., and Menegalli, F.C. (2009) Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *J Food Eng*, **90**, 341–349.
- Departamento de Química Física Universitat de València. Apuntes de Química Física Avanzada. Tema 7. Superficies sólidas: adsorción y catálisis heterogénea. Disponible en http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/Superficies_Solidas_A.pdf [acceso 22/06/2012].
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Jacobs, M., and Debevere, J. (2000) The effect of hexamethylenetetramine-incorporated plastic for the active packaging of foods. *Packag Technol Sci*, **13**, 117–121.
- Di Pietro, S., Haritchabalet, K., Cantoni, G., Iglesias, L., Mancini, S., Temperoni, A., Labanchi, J. L., Barbarossa, N., García, M. T., Cofre, M., Rosales, S., Herrero, E., Bigatti, R., Orellana, O., and Larrieu, E. (2004) Vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos en la provincia de Río Negro, Argentina, 1993-2001. *Medicina Buenos Aires*; **64**, 120-124. ISSN 0025-7680.
- Diario El mundo (2011). El Invima halló bacteria listeria en lotes de salchichas y jamón de pollo
Disponible en:

http://www.elmundo.com/portal/vida/salud/el_invima_hallo_bacteria_listeria_en_lotes_de_s_alchichas_y_jamon_de_pollo_.php [acceso 22/06/2012].

- Dirección de Epidemiología Ministerio de Salud de la Nación. (2011) Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda y Plan de Contingencia de Cólera GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD.
- Dobias, J., Chudackova, K., Voldrich, M., and Marek, M. (2000) Properties of polyethylene ® lms with incorporated benzoic anhydride and/or ethyl and propyl esters of 4-hydroxybenzoic acid and their suitability for food packaging *Food Addit Contam*, **17**, 1047-1053.
- Doyle, M. E. (2007) Microbial Food Spoilage — Losses and Control Strategies. A Brief Review of the Literature. FRI BRIEFINGS. 1-16 Disponible en: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_Microbial_Food_Spoilage_7_07.pdf [acceso 22/06/2012].
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M. and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 564-582.
- Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven H. P., Brurberg M. B., and Nes I. F. (1998) Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria *Appl Environ Microbiol*, **64**, 3275–3281.
- Elmi, M. (2004). Food safety: Current situation, unaddressed issues and the emerging priorities. *East Mediterranean Health J*, **10**, 794–800.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., and Villani, F. (2006a) Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Appl Environ Microbiol*, **72**. 4663–4671.
- Ercolini, D., La Storia, A., Villani, F., and Mauriello, G. (2006b). Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *J Appl Microbiol*, **100**, 765–772.
- European Food Safety Authority (2010) The Community Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J*, **8**, 1496.
- Fadda, S., Vildoza, M.J., and Vignolo, G. (2010). The acidogenic metabolism of *Lactobacillus plantarum* CRL681 improves sarcoplasmic protein hydrolysis during meat fermentation. *Journal of Muscle Foods*, **21**, 545–556.
- Fontana, C., Coconcelli, P. S., and Vignolo, G. (2006) Direct Molecular Approach to Monitoring Bacterial Colonization on Vacuum-Packaged Beef. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 5618–5622.
- Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture (2000) Recall release FSIS-RC-00-022. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr022-2000.htm> [acceso 22/06/2012].
- Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture Washington, D.C. (1999) Recall release FSIS-99-10 Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/prelease/pr011-99.htm> [acceso 22/06/2012].
- Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. (2008) Recall Release FSIS-RC-017-2008 California Firm Recalls Pork Sausages For Possible *Listeria* Contamination. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/Recall_017_2008_Release/index.asp [acceso 22/06/2012].

- Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. (2005) Recall Release FSIS-RC-029-2005 New Jersey Firm Recalls Sausage For Possible *Listeria* Contamination. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/Recall_029_2005_Release/index.asp [acceso 22/06/2012].
- Franklin, N.B., Cooksey, K.D., and Getty, K.J. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with a packaging film coating containing nisin. *J Food Protect*, **67**, 480–485.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas López, R., and Omar N. B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int Food Microbiol*, **120**, 51-70.
- Gennadios, A., Weller, C.L., and Testin, R.F. (1993) Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten- based films. *Cereal Chem*, **70**, 426-429.
- Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N., and Thonart, P. (2006). Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4°C storage. *J Food Protect*, **69**, 1066–1071.
- Ghanbarzadeh, B., and Oromiehi, A.R. (2009). Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. *J Food Eng*, **90**, 517–524.
- Gill, A. O., and Gill, C. O. (2010). Packaging and the Shelf Life of Fresh Red and Poultry Meats. *In: Food Packaging and Shelf Life A Practical Guide*. Gordon L. Robertson (ed), pp. 258-272, Chapter 14. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York
- Glasstone y Lewis (1978) Isoterma de adsorción de Langmuir. Elementos de Química-Física. pp. 671-674. Capítulo 15. Editorial Médico Quirúrgica, Buenos Aires
- Gontard, N., and Guilbert, S. 1994. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *In: Food packaging and preservation*. Mathlouthi, M. (ed.), pp. 159-181, Blackie Academic & Professional, Glasgow
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., and Guilbert, S. (1996) Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. *J Agric Food Chem*, **44**, 1064-1069.
- Goto, Y., Li, B., Claesen, J., Shi, Y., Bibb, M.J., and van der Donk W.A. (2010). Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol.* , **8**, 1-10.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., and Givskov, M. (2002) Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol*, **78** 79– 97.
- Gray, J.J. (2004). The interaction of proteins with solid surfaces. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 110-115.
- Grower, J.L., Cooksey, K., and Getty, K. (2004a) Development and characterization of an antimicrobial packaging film containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect*, **67**, 475-479.
- Grower, J.L., Cooksey, K., and Getty, K. (2004b). Release of nisin from methylcellulose-hydroxypropyl methylcellulose film formed on low-density polyethylene film. *J Food Sci*, **69**, 107-111.
- Guemouri, L., Ogier, J., Zekhnini, Z., and Ramsden, J. J. (2000). The architecture of fibronectin at surfaces. *J Chem Phys*, **113**, 5183-8186.

- Guerra, N.P., Macías, C.L., Agrasar, A.T., and Castro, L.P. (2005a), Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. *Lett in Appl Microbiol*, **40**, 106-110.
- Guerra, N.P., Araujo, A.B., Barrera, A.M., Agrasar A.T., Macías C.L., Carballo, J., and Pastrana, L. (2005b). Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. *J Food Prot*, **68**, 1012-1019.
- Guilbert, S., and Cuq, B. (2005) Material Formed from Proteins. *In: Handbook of Biodegradable Polymers*. Bastioli, C. (ed). pp 339-384, Chapter 11 Rapra Technology Limited. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, United Kingdom.
- Gurasimov, Y.A, Dreving V., Eriomin, E., Kiseliov, A., Lebedev, V., Panchenkov, A., and Shliguin, A. (1986) Ecuación de la isoterma de adsorción de Langmuir. Adsorción de una mezcla de gases. Curso de química física. Moscú, Editorial Mir. p 449-453. Capítulo 16.
- Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., and Berjeaud, M.J. (2000). Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1744-1748.
- Ha, J-U., Kim, Y-M., and Lee, D-S. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packag Technol Sci*, **15**, 55-62.
- Han, J., Castell-Perez, M.E., and Moreira, R.G. (2007). The influence of electron beam irradiation of antimicrobial-coated LDPE/polyamide films on antimicrobial activity and film properties. *LWT - Food Sci Technol*, **40**, 1545-1554.
- Han, J.H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technol*, **54**, 56–65.
- Haugaard, V.K., and Mortensen, G. (2003) Biobased Food packaging. *In: Environmentally friendly Food Processing*. Mattson, B. and Gontard, N. (eds), , Chapter 11. CRC press: Boca Raton, FL.
- Hebert, E. M., Saavedra L., Taranto, M. P., Mozzi, F., Magni, C., Nader, M. E. F., Font de Valdez, G., Sesma, F., Vignolo, G., and Raya R. R. (2012) Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus curvatus* Strain CRL705. *J Bacteriol*, **194**, 538-539.
- Heng, N. C., Wescombe P., Burton J., Jack R., and Tagg J. R. (2007). The diversity of bacteriocins produced by gram-positive bacteria, In M. A. Riley and M. A. Chavan editors. *Bacteriocins—ecology and evolution*. Heidelberg, Germany. Springer. p. 45-92. Chapter IV.
- Hlady, V., H., and Buijs, J. (1996) Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 72-77.
- Ho Lee, C., Soon An, D., Cheol Lee, S.; Jin Park, H., and Sun Lee, D. (2004). A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *J Food Eng*, **62**, 323–329.
- Hochstetter, A., Talja, R. A., Helén, H. J., Hyvöna, L., and Jouppila, K. (2006) Properties of gluten-based sheet produced by twin-screw extruder. *LWT - Food Sci Technol*, **39**, 893-901.
- Hsieh, H-Y., and Glatz, BA (1996). Long-term storage stability of the bacteriocin propionicin PLG-1 produced by *Propionibacterium thoenii* and potential as a food preservative. *J Food Protect*, **59**, 481–486.
- <http://www.agcontrol.gob.ar/pdf/Que-son-las-ETA.pdf> [acceso 22/06/2012].
- <http://www.caicha.org.ar/documentos/datosdelsector.htm> [acceso 22/06/2012].
- <http://www.cdc.gov/outbreaknet/outbreaks.html> [acceso 22/06/2012].

<http://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/> [acceso 22/06/2012].

- Ibarguren, C., Vivas, L., Bertuzzi, M. A., Apella, M. C., and Audisio, M. C. (2010a) Edible films with anti-*Listeria monocytogenes* activity. *Int J Food Sci Technol*, **45**, 1443–1449.
- Ibarguren, C., Audisio, M.C., Farfán Torres, E.M., and Apella, M.C. (2010b), Silicates characterization as potential bacteriocin-carriers. *Innovative Food Sci Emerg Technol*, **11**, 197-202.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., and Gontard, N. (2001) New plasticizers for wheat gluten films. *Eur Polym J*, **37**, 1533–1541.
- Irmak, S., and Erbatur, O. (2008) Additives for environmentally compatible active food packaging. *In: Environmentally compatible food packaging*. Chiellini E. (ed). pp 263-293, Chapter 11. CRC Press. Boca Raton Boston, New York Washington, DC.
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., Niederhäusern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi, G., Anacarso, I., and Bondi, M. (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int J Food Microbiol*, **123**, 281-287.
- Janes, M.E., Nannapaneni, R., Proctor, A., and Johnson, M.G. (1998). Rice hull ash and silicic acid as adsorbents for concentration of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 4403-4409.
- Janes, M.E., Kooshesh, S., and Johnson, M.G. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. *J Food Sci*, **67**, 2754–2757.
- Joerger, R.D. (2007). Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packag Technol Sci*, **20**, 231–273.
- Joosten, H.M., and Nuñez, M. (1995), Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surfaces and its prevention by Tween 80. *Lett Appl Microbiol*, **21**, 389-392.
- Jung, D-S., Bodyfelt, F.W., and Daeschel, M.A. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J Dairy Sci*, **75**, 387–393.
- Karlsson, M., Ekeröth, J., Elwing, H., and Carsson, U. (2005). Reduction of irreversible protein adsorption on solid surfaces by protein engineering for increased stability. *J Biol Chem*, **280**, 25558-25564.
- Kaur, K., Andrew, L.C., Wishart, D.S., and Vederas, J.C. (2004). Dynamic relationships among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic α helix as a receptor-binding region. *Biochemistry*, **43**, 9009-9020.
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., samant, S.K., and Itoh, T. (1994) Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 1218-1221.
- Kim, J-H., and Yoon, J-Y. (2002). Protein adsorption on polymer particles. *In: Encyclopedia of Surface and Colloid Science*; A. Hubbard (ed), pp 4373-4381. Marcel Dekker: New York.
- Kim, Y-M., An, D-S., Park, H-J., Park, J-M., and Lee, D-S. (2002). Properties of nisin-incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. *Packag Technol Sci*, **15**, 247–254.

- Kleijn, M., and Norde, W. (1995) The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces. *Heteroge Chem Rev*, **2**, 157-172.
- Klontz, K.C., McCarthy, P.V., Datta, A.R., Lee, J.O., Acheson, D.W., and Brackett, R.E. (2008) Role of the U.S. Food and Drug Administration in the regulatory management of human listeriosis in the United States. *J Food Prot*, **71**, 1277-86.
- Knerr, P. J., and van der Donk, W.A. (2012) Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides, *Annu Rev Biochem*, **81**, 479-505
- Korkeala, H.J., and Björkroth, K.J. (1997). Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *J Food Protect*, **60**, 724–731.
- Koutsoumanis, K. , and Nychas, G.-J.E. (2000) Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *Int J Food Microbiol*, **60**, 171-184
- Koutsoumanis, K.P., and Sofos J.N. (2004). Microbial contamination of carcasses and cuts. *In: Encyclopedia of Meat Sciences*. Jensens, WK.(ed). pp. 727–737. Elsevier Academic Press, Amsterdam
- Kraśniewska, K., and Małgorzata, G. (2012) Substances with Antibacterial Activity in Edible Films – A Review. *Pol J Food Nutr Sci*, **62**, 199-206
- Krisdhasima, V., McGuire, J., and Sproull, R. (1992). Surface Hydrophobic influences on β -lactoglobulin adsorption kinetics. *J Colloid Interface Sci*, **154**, 337-350.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Sci*, **52**, 299-305.
- Lahuerta A, Westrell T, Takkinen J, Boelaert F, Rizzi V, Helwigh B, Borck B, Korsgaard H, Ammon A, and Makela P. (2011) Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. *Euro Surveill*. 2011;16 (13):pii=19832.
- Lakamraju, M., McGuire, J., and Daeschel, M. (1995) Nisin Adsorption and Exchange with Selected Milk Proteins at Silanized Silica Surfaces. *J Colloid Interface Sci*, **178**, 495–504
- Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J Am Chem Soc*, **40**, 1361-1403.
- Lee, D.S. (2010). Packaging and the Microbial Shelf Life of Food. *In: Food Packaging and Shelf Life A Practical Guide*. Gordon L. Robertson (ed) pp 55-80. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
- Leistner, L., and Gould, G.W. (2002). Hurdle Technologies: Combination Treatments for Food Stability, Safety and Quality. *In: Food Engineering Series*. Leistner, L., and G.W. Gould (eds.) pp. 1-15. Chapter 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Leroy, F., Vasilopoulos, C., Van Hemelryck, S., Falony, G., and De Vuyst, L. (2009). Volatile analysis of spoiled, artisan-type, modified-atmosphere-packaged cooked ham stored under different temperatures. *Food Microbiol*, **26**, 94–102.
- Lizaso, G., Chasco, J., and Beriain J. M. (1999). Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichoón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiol*, **16**, 219-228.
- López C., Feltri, A., Leotta, G., González, G., Manfredi, E., Gottardi, G., Elder, M., De las Carreras, S., Patri, C., Guajardo, F., San Martín, A., and Rivas, M., (2008) Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Rev Argent Microbiol*, **40**, 198-203.

- Luchansky J.B., and Call J.E. (2004). Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters. *J Food Prot*, **67**, 1017-1021.
- Lücke, F-K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci*, **56**, 105-115.
- Lungu, B., and Johnson G.M. (2005). Potassium sorbate does not increase control of *Listeria monocytogenes* when added to zein coatings with nisin on the surface of full fat turkey frankfurter pieces in a model system at 4°C. *J Food Sci*, **70**, 95-99.
- Lutanie, E., Voegel, J.C., Schaaf, P., Freund, M., Cazenave, J.P., and Schmitt, A. (1992). Competitive adsorption of human immunoglobulin G and albumin: consequences for structure and reactivity of the adsorbed layer. *Proc Nati Acad Sci USA*, **89**, 9890-9894.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L-P., van den Braak N., Endtz, H. P., Naumann, D., and Puppels, G.J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods*, **51**, 255-271.
- Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J. M., and Garriga, M. (2007). Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Int J Food Microbiol*, **120**, 152–158.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M., and Arnau, J. (2013). Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control*, **30**, 325-330.
- Marklinder, I., Lindblad, M., Eriksson, L., Finnson, A., and Lindqvist, R. (2004). Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in Sweden. *J Food Prot*, **67**, 2570–2577.
- Martínez, J.M., Kok, J., Sanders, J.W., and Hernandez, P.E. (2000). Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3543-3549.
- Martin-Visscher L. A., van Belkum M. J., and Vederas J.C. (2011). Class IIc or Circular Bacteriocins. In: Prokaryotic antimicrobial peptides. From genes to applications, Drider, D. and Rebuffat S. (eds), pp 213-236. Springer, New York.
- Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica, M.G., and Alvarez, E.E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Rev Argent Microbiol*, **36**, 179-181.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H., Vaidanis, A., and Metaxopoulos, I. (2006). Development of a Predictive Model for Spoilage of Cooked Cured Meat Products and Its Validation Under Constant and Dynamic Temperature Storage Conditions. *J Food Sci*, **71**, 157-167.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H. (2007) Shelf Life Establishment of a Sliced, Cooked, Cured Meat Product Based on Quality and Safety Determinants. *J Food Protect*, **70**, 1881-1889.
- Mauriello, G., Ercolini, D., La Stora, A., Casaburi, A., and Villani, F. (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J Appl Microbiol*, **97**, 314-322.
- McAuliffe, O., Ryan, M.P., Hill, C., Breeuwer, P., and Abee, T. (1998). Lactigin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectivity dissipates the membrane potential. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 439-445.

- McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci*, **80**, 43–65.
- Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, Di., Keller, S., Gühring, H., Vértesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., Brönstrup, M., Sheldrick, G. M., and Süßmuth, R. D. (2010). Labyrinthopeptins: A New Class of Carbacyclic Lantibiotics. *Angew Chem Int*, **49**, 1151 – 1154.
- Metaxopoulos, J., Kritikos D., and Drosinos E.H. (2003). Examination of microbiological parameters relevant to the implementation of GHP and HACCP system in Greek meat industry in the production of cooked sausages and cooked cured meat products. *Food Control*, **14**, 323–332.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M., and Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *J Agric Food Chem*, **48**, 2948-2953.
- Millette M., Le Tien C., Smoragiewicz W., and Lacroix M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads *Food Control*, **18**, 878–884.
- Min, S., Harris, L.J., and Krochta, J.M. (2005) Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci*, **70**, 333–338.
- Min, S., Harris, L., and Krochta, J.M. (2006). Inhibition of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 on roasted turkey by edible whey protein coatings incorporating the lactoperoxidase system. *J Food Prot*, **69**, 784–793.
- Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W., and Sandine, W.E. (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci*, **62**, 413–415.
- Mocquot, G. and Lefebvre, E. (1956). A simple procedure to detect nisin in cheese. *J Appl Bacteriol*, **19**, 322–323.
- Mondry, H. (1996). Packaging systems for processed meat, in Meat quality and meat packaging. Severini, R. M. and Smulders, F.J.M. (eds) pp 323-333. S.A. Taylor, Utrecht, Holland: ECCEAMST.
- Morel, M.H.; Bonicel, J, Micard, V., and Guilbert, S. (2000) Protein insolubilization and thiol oxidation in sulfite-treated wheat gluten films during aging at various temperatures and relative humidities. *J. Agric. Food Chem*, **48**, 186–192.
- Morgan, S.M., Galvin, M., Ross, R.P., and Hill, C. (2001). Evaluation of spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett Appl Microbiol*, **33**, 387-391.
- Motta, A.S., Flores, F.S., Souto, A.A., and Brandelli, A. (2008). Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus sp* P34 that targets the bacterial cell envelope. *Antoine Van Leeuwenhoek*, **93**, 275-284.
- Nagel, H. (1968). Composite film structure and process. US Patent 3375126.
- Nakanishi, K., Sakiyama, T., and Imamura, K. (2001). On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng*, **91**, 233-244.
- Nasir, A., and McGuire, J. (1998). Sequential and competitive adsorption of bovine serum albumin and b-lactoglobulin, and their resistance to exchange with α -lactalbumin and β -casein. *Food Hydrocolloids*, **12**, 95-103.

- Natrajan, N., and Sheldon, B.W. (2000) Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella* Typhimurium on fresh broiler skin. *J Food Prot*, **63**, 1189–1196.
- Neetoo, H., Ye, M., and Chen, H. (2007). Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect*, **70**, 1267–1271.
- Nielsen, J.W., Dickson, J.S., and Crouse, J.D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl Environ Microbiol*, **56**, 2142–2145.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., and Nes, I.F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**, 5686-5692.
- Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegård C., Haugen H.S., and Kristiansen P.E. (2009) Structure-Function Relationships of the Non-Lanthionine-Containing Peptide (class II) Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*, **10**, 19-37.
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., and Kristiansen, P. E (2010) Structure and Mode-of- action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics and Antimicro Prot*, **2**, 52–60.
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Hauguen, H.S., and Kristiansen, E. (2011). The two-peptide (Class IIB) bacteriocins: genetics, biosynthesis, structure and mode of action. *In: Prokaryotic antimicrobial peptides. From genes to applications*, Drider, D. and Rebuffat S. (eds), pp. 197-212. Springer, New York.
- Norde, W., Macritchie, F., Nowicka, G., and Lyklema, J. (1986). Protein adsorption at solid-liquid interfaces: reversibility and conformation aspects. *J Colloid Interface Sci*, **112**, 447-456.
- Noticias de la Industria Alimentaria (2009). Argentina - Ordenan retirar del mercado salchichas contaminadas. Disponible en: http://www.inocuidad-alimentaria.com/news/alertas_retiro/nota892.htm. [acceso 10/06/2012].
- Nychas, G-J., Marshall, D., and Sofos, J. (2007) Meat poultry and seafood. *In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (eds). pp 105-140. Chapter 6. Washington, DC: ASM Press.
- Nychas, G-J., Skandamis, P., Tassou, C., and Koutsoumanis, K. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*, **78**, 77–89.
- Ockerman, H.W., and Basu L. (2010) Fermented Meat Products: Production and Consumption <http://hdl.handle.net/1811/45275>.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., and Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr J Biotechnol*, **2**, 219–227.
- Olabarrieta, I., Cho, SW., Gällstedt, M., Sarasua, JR., Johansson, E., and Hedenqvist, MS. (2006) Aging properties of films of plasticized vital wheat gluten cast from acidic and basic solutions. *Biomacromolecules*, **7**, 1657-1664.
- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., and Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *J Food Eng*, **70**, 205–210.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., and Holley, R.A. (2000) Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol*, **62**, 139–148.

- Ouattara, B., Giroux, M., Yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Borsa, J., and Lacroix, M. (2002). Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating film. *Radiat. Phys. Chem*, **63**, 299–304. doi:10.1016/S0969-806X(01)00516-3.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., and Lacroix, M. (2004) Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric. Food Chem*, **52**, 5598–5605.
- Palacios, J., Vignolo, G.M., Farías, M.E., Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., and Sesma, F. (1999). Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. *Microbiol. Res.* **157**, 199-204.
- Palacios, J.M. (2000) Estudio químico y biotecnológico de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas [Tesis doctoral]. San Miguel de Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, p 44-45.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D., and Ambrosiadis, I. (2006) Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor “indicator microorganism”. *Microb Cell Fact*, **5**, 30-44.
- Parente, E., and Ricciardi, A. (1999) Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**, 628-638.
- Paulsen, P., Vali, S., and Bauer, F. (2011). Quality traits of wild boar mould-ripened salami manufactured with different selections of meat and fat tissue, and with and without bacterial starter cultures. *Meat Sci*, **89**, 486–490.
- Pellicer K, Copes J, Malvestiti L, Lanfranchi M, Stanchi N, Echeverria G, and Nosetto, E. (2002) Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp.* in dry sausages obtained in markets in the city of La Plata, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, **34**, 219-21.
- Pérez-Pérez, C., Regalado-González, C., Rodríguez-Rodríguez, C.A., Barbosa-Rodríguez, J.R., and Villaseñor-Ortega, F. (2006). Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings, in *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, ed. by Guevara-González RG and Torres-Pacheco I. Research Signpost, Kerala, pp. 193–216.
- Piper, P., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2009) Discovery of Medically Significant Lantibiotics. *Curr Drug Discovery Technol*, **6**, 1-18.
- Pongtharankul, T. y Demirci, A. (2004). Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**, 268-272.
- Porto M. F., Giroto E. M., Kunita, M. H., Gonzalves, M. C., Muniz, E. C., Rubira, A.F., and Radovanovic, E. (2004). Atomic force microscopy, scanning electric potential microscopy and contact-angle surface analysis of low-density polyethylene grafted with maleic anhydride. *Prog Colloid Polym Sci*, **128**, 86–91.
- Question number EFSA-Q-2005-031 (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to the use of nisin as a food additive. *The EFSA Journal*, **314**, 1-16.
- Quinteiro Rodriguez, M.P. (2000). Fourier Transform Infrared (FTIR) technology for the identification of organisms. *Clin Microbiol Newsl*, **22**, 57-61.
- Rabe, M., Verdes, D., and Seeger, S. (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, **162**, 87-106.

- Ramsden, J.J. (1993). Concentration scaling of protein deposition kinetics. *Phys Rev Lett*, **71**, 295-298.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., and Hill, C. (2011). Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In D. Drider, & S. Rebuffat (Eds), *Prokaryotic antimicrobial peptides. From genes to applications* (pp. 29-53). New York: Springer.
- Reglamento (CE) N° 1935/2004 del 27 de octubre de 2004, sobre Materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, derogación de Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.
- Reglamento (CE) N° 450/2009 sobre Materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Resolución Mercosur/GMC/RES. N° 056/92 "Disposiciones Generales para Envases y Equipamientos Plásticos en Contacto con Alimentos".
- Resolución Mercosur/GMC/RES. N° 32/07 sobre "Lista positiva de aditivos para materiales plásticos destinados a la elaboración de envases y equipamientos en contacto con alimentos" (Derogación de las Res. GMC N° 95/94 y 50/01).
- Resolución Mercosur/GMC/RES. N° 32/10 sobre "Migración en materiales, envases y equipamientos plásticos destinados a estar en contacto con alimentos" (Derogación de las Res. GMC N° 30/92, 36/92, 10/95, 11/95, 15/97, 32/97 y 33/97).
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., and Leotta, G.A. (2006) Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina Buenos Aires*, **66**, 27-32. ISSN 0025-76287.
- Roach P., Farrar D., and Perry C.C. (2005) Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes. *J Am Chem Soc*, **127**, 8168-8173.
- Robertson, G.L., (2006a) Edible and biobased food packaging materials. In *Food packaging principles and practice*, 2nd ed. Robertson. G.L., (ed). pp 43-54, Chapter 3. Taylor & Francis: Boca Raton, FL.
- Robertson, G.L. (2006b) Shelf life of foods. In: *Food packaging principles and practice*, 2nd ed. Robertson. G.L., (ed). pp 225-254, Chapter 11. Taylor & Francis: Boca Raton, FL.
- Robertson, G.L. (2006c). Packaging of flesh foods. In: *Food packaging principles and practice*, 2nd ed. Robertson, G.L. (ed). pp 331-360, Chapter 16. Taylor & Francis: Boca Raton, FL.
- Robertson, G.L. (2006d) Introduction to food packaging. In: *Food packaging principles and practice*, 2nd ed. Robertson, G.L., (Ed). pp 1-7, Chapter 1. Taylor & Francis: Boca Raton, FL.
- Robertson G. (2008). State-of-the-art biobased food packaging materials. In: *Environmentally compatible food packaging* E. Chiellini (ed.) pp 3-28. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Rogers, A.M., and Montville, T.J. (1991). Improved agar diffusion assay for nisin quantification. *Food Biotechnol*, **5**, 161-168.
- Roldán, M. L., Chinen, I., Otero J. L., Miliwebsky E. S., Alfaro N., Burns P., and Rivas M. (2007). Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Rev Argent Microbiol*, **39**, 113-119.
- Ryder, M. P., Schilke, K. F., Auxier, J. A., McGuire, J., and Neff, J. A. (2010). Nisin adsorption to polyethylene oxide layers and its resistance to elution in the presence of fibrinogen, *J Colloid and Interface Sci*, **350**, 194-199.

- Saavedra, L., Castellano, P., and Sesma, F. (2004). Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *In: Methods in molecular biology*, Spencer, J.F.T. and Ragout de Spencer, A.L. (eds).pp. 331-336, Chapter 21. Totowa, NJ, Humana Press.
- Saavedra, L., and Sesma, F. (2011). Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria. *In: Prokaryotic antimicrobial peptides, From genes to applications*, Drider, D., Rebuffat, S. (eds), pp. 99-113. Springer, New York.
- Samelis, J., Kakouri, A., and Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol*, **17**, 329–340
- Sarkar, D, and Chatteraj, D.K. (1993). Activation parameters for kinetics of protein adsorption at silica-water interface. *J Colloid Interface Sci*, **157**, 219-226.
- Scannell, A.G., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., and Arendt, E.K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lactacin 3147 and Nisaplin. *Int J Food Microbiol*, **60**,241–249.
- Schilke, K. F., and McGuire, J. (2011) Detection of nisin and fibrinogen adsorption on poly(ethylene oxide) coated polyurethane surfaces by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). *J Colloid Interface Sci*, **358**, 14–24.
- Scully, A. (2009) Active packaging. *In: The Wiley encyclopedia of Packaging Technology*. Kit L.Yam (eds.), pp. 2-8. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Sebti, I., and Coma, V. (2002). Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydr Polym*, **49**, 139-144.
- Sebti, I., Ham-Pichavant, F., and Coma, V. (2002). Edible bioactive fatty acid-cellulosic derivative composites used in food-packaging applications. *J Agric Food Chem*, **50**, 4290-4294.
- Sebti, I., Delves-Broughton, J., and Coma, V. (2003) Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing cross-Linked hydroxypropylmethylcellulose films. *J Agric Food Chem*, **51**, 6468-6474.
- Shirtcliffe, N. J., Aqil, S., Evans, C., McHale, G., Newton, M. I., Perry, C. C., and Roach, P. (2004). The use of high aspect ratio photoresist (SU-8) for super-hydrophobic pattern prototyping. *J Micromech Microeng*, **14**, 1384-1389.
- Silveira, M. F. A., Soares N. F. F, Geraldine R. M., Andrade N. J., and Gonçalves M. P. J. (2007). Antimicrobial Efficiency and Sorbic Acid Migration from Active Films into Pastry Dough. *Packag Technol Sci*, **20**, 287–292.
- Siragusa, G.R., Cutter, C.N., and Willett, J.L. (1999). Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol*, **16**, 229–23.
- Soliman, W., Wang, L., Bhattacharjee, S., and Kaur, K. (2010). Structure-activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin S from two-peptide class IIb bacteriocins. *J Med Chem*, **54**, 2399–2408.
- Song, Y-h., Zheng, Q., and Lai, Z-z. (2008). Properties of thermo-molded gluten/glycerol/silica composites. *Chin J Polym Sci*, **26**, 631–638.
- Soriano, A., Cruz, B., Gómez, L., Mariscal, C., and García Ruiz, A. (2006). Proteolysis, physicochemical characteristics and free fatty acid composition of dry sausages made with deer (*Cervus elaphus*) or wild boar (*Sus scrofa*) meat: A preliminary study. *Food Chem*, **96**, 173–184.

- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., and Bigger, S. W. (2006). Characterization of Antimicrobial Films Containing Basil Extracts. *Packag Technol Sci*, **19**: 259–268.
- Tai, Y-C., Joshi, P., McGuire, J., and Neff, J.A. (2008). Nisin adsorption to hydrophobic surfaces coated with the PEO-PPO-PEO triblock surfactant Pluronic® F108. *J Colloid Interface Sci*, **322**, 104-111.
- Talbot, J., Tarjus, G., Van Tassel, P.R., and Viot, P. (2000). From car parking to protein adsorption: an overview of sequential adsorption process. *Colloids Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **165**, 287-324.
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., and Zhong, Q. (2007). Extraction of nisin from a 2.5% commercial nisin product using methanol and ethanol solutions. *J Food Prot*, **70**, 1272-1276.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R., and Delves-Broughton, J. (2000) Nisin. In: Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu, A.S. (ed). pp. 463-524. CRC Press Boca Raton, Florida.
- Tropini, V., Lens, J-P., Mulder, W.J., and Silvestre, F. (2004). Wheat gluten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. *Ind Crops Prod*, **20**, 281-289.
- Twede, D. (2009). Economics of packaging. In: The Wiley encyclopedia of Packaging Technology. Kit L.Yam (eds.), pp. 383-389. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Uteng, M., Hauge, H.H., Brondz, I., Nissen-Meyer, J., and Gunnar, F. (2002). Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 952-956.
- Uteng, M., Hauge, H. H., Markwick P. R. L., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J., and Muhle-Goll C. (2003). Three-Dimensional Structure in Lipid Micelles of the Pediocin-like Antimicrobial Peptide Sakacin P and a Sakacin P Variant That Is Structurally Stabilized by an Inserted C-Terminal Disulfide Bridge. *Biochemistry*, **42**, 11417-11426.
- van Kuijk, S., Noll, K.S. and Chikindas, M.L (2011). The species-specific mode of action of the antimicrobial peptide subtilisin against *Listeria monocytogenes* Scott A. *Lett Appl Microbiol*, **54**, 52–58.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L., and Leroy, F. (2010) Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiol*, **27**, 77–84.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G.H., O'Sullivan, T.F., O'Hanlon, K., and van Sinderen, D. (2001) An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J Appl Microbiol*, **91**, 131-138.
- Vaughan, A., Eijsink V. G. H., and van Sinderen, D. (2003) Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 7194–7203.
- Vera Pingitore, E., Salvucci, E., Sesma, F., and Nader-Macías, M. E. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A Méndez Vilas (ed.) pp. 557 – 568. Formatex, Badajoz.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addit Contam*, **19**, 163–171.
- Vignolo, G., Suriani, F., Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J Appl Bacteriol*, **75**, 344-349.

- Vignolo, G., Kairuz, M.N., Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. (1995). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J Appl Bacteriol*, **78**, 5-10.
- Vignolo, G., Cuozzo, S., De Kairuz, M.N., Holgado, A.P. de R., and Oliver, G. (1996a). *Listeria monocytogenes* inhibition in meat slurry by in situ produced lactocin 705. *Microbiol Alim Nutr*, **14**, 363-367.
- Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., de Ruiz Holgado, A.A.P., and Oliver, G. (1996b). Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Int J Food Microbiol*, **29**, 397-402
- Vignolo, S., Fadda, S., and Castellano, P. (2008) Bioprotective cultures. *In: Meat Biotechnology*, Toldrá F. (ed). pp. 399-424. Springer, New York.
- Vignolo, G.M., Fontana, C., and Cocconcelli, P.S. (2010). New approaches for the study of lactic acid bacteria biodiversity: A focus on meat ecosystems. *In: Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Mozzi, F., Raya, R. y Vignolo, G. (eds), pp. 251-271, Chapter 14. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F., and Raya, R. (2012) Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. *In: Progress in Food Preservation*, Bhat, R., Alias, A.K. and Paliyath, G. (eds), pp. 453-483. Wiley-Blackwell: Ocford, UK.
- Vodnar, D.C., Paucean, A., Duluf, F.V., and Socaciu, C. (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, **38**, 109-113.
- Walsh, H.M., and Kerry, J.P. (2002) Meat packaging. *In: Meat Processing: Improving Quality*. Kerry, J.P., Kerry, J.F., Ledward, D.A. (eds). pp 417-452, Chapter 20. Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Wan, V.Ch-H., Kim, M.S., and Lee, S-Y. (2005). Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. *J of Food Sci*, **70**, 387-391.
- Wei, Z., Huang, W., Hou, G., Yuan, Z., and Fang, J. (2007). Studies on adsorption isotherms of endotoxin and BSA using an affinity column. *Process Biochem*, **42**, 285-288.
- Wolf, C.E., and Gibbons, W.R. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J Appl Microbiol*, **80**, 453-457.
- Woo-Jin, J., Mabood, F., Souleimanov, A., Zhou, X., Jaoua, S., Kamoun, F., and Smith, D.L. (2008). Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*. *J Microbiol Biotechnol*, **18**, 1836-1840.
- www.caicha.org.ar/documentos/caracterizacion.ppt [acceso 22/06/2012].
- www.paho.org/spanish/d/p65.pdf. Prevención y control de enfermedades (1998). Organización panamericana de la salud. [acceso 22/06/2012].
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Hawai, Y., Inoue, N., and Montville, T.J. (2005). Purification of a novel class IIa bacteriocin, piscicolin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 554-557.
- Yang, R., Johnson, M.C., and Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 3355-3359.

- Zapico, P., de Paz, M., Medina, M., and Nuñez, M., (1999). The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *Int J Food Microbiol*, **46**,151–157.
- Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006). Lactococcin Q. a novel two-peptide bacteriocin produced by lactococcus lactis QU 4. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 3383-3389.
- Zhang, Y., and Han J. H. (2006). Plasticization of Pea Starch Films with Monosac and Polyols. *J Food Sci*, **71**, 253-261.
- Zhang, L., and Zeng, M. (2008). Proteins as Sources of Materials. *In: Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Belgacem, M.N. and Gandini, A. (eds). pp 479-493. Chapter 23. Elsevier The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK.
- Zhang, X., Burgar, I., Do, M.D., and Loubakos, E. (2005) Intermolecular interactions and Phase structures of plasticized wheat proteins materials. *Biomacromolecules*, **6**, 1661-1671.
- Zhang, X., Do, M. D., Kurniawan, L., and Qiao, G. G. (2010) Wheat gluten-based renewable and biodegradable polymer materials with enhanced hydrophobicity by using epoxidized soybean oil as a modifier. *Carbohydr Res*, **345**, 2174–2182.
- Zivanovic, S., Chi, S., and Draughton, A.E. (2005) Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci*, **70**, 45–51.