

**PELÍCULAS COMESTIBLES DE CASEINATO DE SODIO Y CARRAGENINA  
COMO ACARREADORAS DE BACTERIAS LÁCTICAS TERMOTOLERANTES.  
INHIBICIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS *in vitro*.**

Alfonso Totosa<sup>a,\*</sup> María de Lourdes Pérez-Chabela<sup>b</sup>, Reyna Gutiérrez-Cruz<sup>a</sup>.

**a** Laboratorio & PP de Alimentos, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, División de Ingeniería Química y Bioquímica. Av. Tecnológico esq. Av. Central, Col. Valle de Anáhuac, CP 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México.

**b** Bioquímica de Macromoléculas, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Av. San Rafael Atlixco 86, Col. Vicentina, CP 09270, Iztapalapa, Distrito Federal, México \* [atotosa@tese.edu.mx](mailto:atotosa@tese.edu.mx).

**RESUMEN:**

En las últimas décadas, la demanda de los consumidores por alimentos sanos que sean prácticos para consumir, inocuos con una vida útil más prolongada, con utilización de empaque de amigables con el ambiente, ha impulsado a la industria de alimentos y a los investigadores a desarrollar nuevas estrategias para su procesamiento, manipulación y empaque. Las películas sirven como una barrera contra la pérdida de humedad y como una vía de transporte para diferentes compuestos bioactivos, algunos de los cuales al tener un efecto antimicrobiano sobre microorganismos patógenos de relevancia, garantizan la inocuidad de los alimentos. Tal es el caso de los metabolitos producidos por algunas bacterias lácticas (como *Pediococcus pentosaceus*) que pueden lograr inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. El objetivo de este trabajo fue elaborar películas de caseinato de sodio con carrageninas (Iota, Kappa o Lambda) como vehículo acarreador (viabilidad) de *P. pentosaceus*, determinando la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos de interés alimenticio (*Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), mediante la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer, con una variante de temperatura (4°C y 25°C).

**ABSTRACT:**

In recent years, consumers' demands for healthy foods easy-to-eat, innocuous, with longer shelf-life, besides to employ environmental friendly package, has been increased. This has made that food industry and food scientists develop new strategies to process, handling and package foods. Edible films are a barrier to control moisture loss and like a way to transport different bioactive compounds, some with an anti-microbial effect against pathogen microorganisms, ensuring food safety. Metabolites produced by lactic acid bacteria (like *Pediococcus pentosaceus*) can inhibit the growth of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. The aim of this work was to elaborate casein edible films with carrageenans (Iota, Kappa or Lambda) as carrier for *P. pentosaceus* (viability), determining their antimicrobial activity against food pathogens (*Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), by the diffusion in agar Kirby-Bauer technique, at two temperatures (4 °C and 25 °C)

**Palabras clave:**

Películas comestibles, bacterias ácido lácticas, antimicrobianos

**Keyword:**

Edible films, lactic acid bacteria, antimicrobials

**Área:** Alimentos funcionales.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) proporcionan sabor, textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos como es el caso de productos fermentados tales como yogurt, quesos madurados, productos cárnicos y también en algunas hortalizas. Además, durante la última década muchas investigaciones han sido publicadas en el uso de la biopreservación, incluyendo estudios de la producción y caracterización de bacteriocinas de distintas BAL, los cuales han demostrado que la producción de bacteriocinas por parte de éstas, reduce o inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria, ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros, que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos, esto porque tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares. Esta característica podría ser aprovechada en la industria de los alimentos. Algunas bacteriocinas se podrían utilizar en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se podrían aplicar para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y/o listerias, respectivamente.

Las bacterias ácido lácticas además de producir una caída en los niveles de pH, favorecen la preservación de alimentos mediante la producción de sustancias inhibitoras más allá de los ácidos láctico, acético, alcohol y dióxido de carbono, incluyendo etanol, reuterina, dipéptidos cíclicos e hidroxiácidos de cadena corta, diacetil, peróxido de hidrógeno, benzoato y antibióticos, además de las ya mencionadas bacteriocinas. También cabe tener en cuenta que algunos de estos microorganismos resultan beneficiosos al inhibir el crecimiento de patógenos por el simple hecho de consumir los recursos que éstos necesitan para sobrevivir y multiplicarse. Las industrias de alimentos que deseen prescindir del uso de conservantes para poder catalogar sus productos como “naturales”, pueden utilizar bacterias ácido lácticas, las cuales son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables a través de sus metabolitos. Tanto las BAL como algunos de sus metabolitos desempeñan un papel importante en este fenómeno y presentan la ventaja de ser reconocidos como ingredientes seguros (GRAS, generally recognized as safe, sus siglas en inglés) por las entidades regulatorias de alimentos de Estados Unidos (FDA) y la Unión Europea.

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de una bacteria láctica termotolerante (*Pediococcus pentosaceus*) en una película comestible de caseinato de sodio y carrageninas (Iota, Kappa o Lambda), a fin de determinar las propiedades antimicrobianas de las películas *in vitro* como vehículo acarreador frente a bacterias patógenas de interés alimenticio (*Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Películas comestibles y microorganismos**

Para la elaboración de la matriz biopolimérica (película comestible) se utilizó caseinato de sodio al 8% p/v (DVA Mexicana S.A. de C.V., Naucalpan de Juárez, México) y glicerol 0.4% v/v (Fermont, Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V., Monterrey, México) como plastificante. A las soluciones de caseinato de sodio con glicerol se agregaron las proporciones (0.3 % p/v) de los tres tipos de carrageninas: kappa-carragenina Gelcarin GP8612, lambda-carragenina Viscarin GP 209 o iota-carragenina Viscarin SD 389 (FMC BioPolymers, Philadelphia, USA). Los medios de cultivo utilizados fueron agar MRS (Difco), Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) Bioxon, Agar Mueller-Hilton (Bioxon), Caldo MRS (Difco), Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) Bioxon, Solución salina al 0.85% como diluyente. El agente antimicrobiano a probar fue la bacteria ácido láctica *Pediococcus pentosaceus*. Los microorganismos patógenos utilizados fueron *Listeria innocua* en medio BHI, *Escherichia coli* en medio BHI, y *Staphylococcus aureus* en medio BHI.

### **Preparación de la matriz biopolimérica con células de BAL**

La preparación de la matriz biopolimérica con las BAL y la prueba de viabilidad en la película se determinó de acuerdo al método descrito por Sánchez-González et al. (2014). Se regeneró el cultivo transfiriendo 0.5ml de *Pediococcus pentosaceus* en 10 mL de caldo MRS incubado a 37 °C durante 24 h. Se toma una alícuota de 3 mL del cultivo anterior se transfirió a 7 mL de caldo MRS nuevo y se incubó a 37 °C durante 5 h. Se recogen las células por centrifugación a 2000×g durante 20 min lavando dos veces con agua estéril. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se incorporaron a la solución dispersa formadora de la película (0.1mL/37.5 g) agitando durante 5 min, esta relación se fijó para tener una concentración final de 7 ciclos log/cm<sup>2</sup> en la solución de la película. La solución se vertió en las placas de vidrio (140×180 mm) y se secaron a 25°C y 50 %HR durante 48 h.

### **Prueba de viabilidad**

Una vez secas las películas se pre-acondicionaron a dos temperaturas diferentes a 4°C y a 25°C durante 7 días, antes de las pruebas. Una vez pre-acondicionadas las películas se colocaron en frascos de dilución estéril con 100mL de solución salina. Se homogeneizó durante 2 minutos. Se realizaron las diluciones hasta 10<sup>-7</sup> y se vertió sobre el agar MRS incubando 48h a 37 °C, posteriormente se contaron las colonias, todas las pruebas se realizaron por duplicado.

### **Reactivación de las cepas patógenas**

Se tomó una asada del agar inclinado con *Listeria innocua* y se sembró en 3 mL de caldo Infusión cerebro corazón (BHI), incubando a 37°C durante 12 h. Los 3 mL se adicionaron a 7 ml de caldo BHI nuevo y se incubó a 37°C por 24 h. De esta misma manera se procedió para las cepas de *Escherichia coli* y para *Staphylococcus aureus*, en el mismo medio a las mismas condiciones.

**Prueba de eficiencia antimicrobiana**

Para evaluar la prueba antimicrobiana en películas a las que se han incorporado agentes antimicrobianos, se puede usar el método de difusión en agar Kirby-Bauer con ciertas modificaciones, propuesto por Ayala-Valencia et al. (2013). Se obtiene un círculo de película de 6mm de diámetro y se coloca en una caja de petri con agar Mueller-Hilton y agar BHI (solo para verificar el resultado), previamente inoculada con el microorganismo de interés (0.2 mL de inóculo que contenga 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/mL. Las cajas se incuban a 37 °C durante 24 h, después de lo cual se determina el área de inhibición microbiana. Si la zona no es clara después de la incubación, se asume que la película y el agente antimicrobiano adicionado no presentaron inhibición (Maizura et al., 2007). La actividad inhibidora de la película se cuantificó midiendo las zonas de inhibición alrededor de los discos de la película, de acuerdo a: Diámetro del halo de inhibición = Radio de la zona de inhibición×2 + Ø disco de la película (6mm).

**RESULTADOS**

La viabilidad de *P. pentosaceus* añadido a películas de biopolímeros se estudió durante dos condiciones de elaboración de películas: 4°C (temperatura de refrigeración) y 25°C (temperatura ambiente). El objetivo fue ver qué etapa de temperatura afectaba las condiciones de crecimiento y por ende la viabilidad de *P. pentosaceus*. En la Tabla I se muestra la viabilidad que presentó cada película con iota, kappa o lambda, observamos que lambda presentó la mejor viabilidad para *Pediococcus pentosaceus*, la cuenta inicial con la que se inoculó cada película fue de 1×10<sup>7</sup> y la película formulada con lambda carragenina pre-acondicionada a 4 °C tuvo la misma cuenta, aunque a 25 °C se redujo un ciclo logarítmico. Para kappa pre-acondicionada a 4 °C y 25 °C también se disminuyó un ciclo logarítmico. Finalmente, para iota se redujeron 2 ciclos logarítmicos. Este fenómeno de reducción de viabilidad de *P. pentosaceus* lo atribuimos a la solubilidad de cada película, ya que, las interacciones proteína-polisacáridos son diferentes para cada tipo de carragenina, siendo así, de acuerdo a lo observado, que lambda mostraba mayor solubilidad, kappa se mantuvo en un lugar medio de solubilidad y iota presentó muy poca solubilidad, esto influyendo en la disponibilidad que las bacterias tuvieron ya que al ser más fuerte la interacción de iota carragenina las bacterias quedaban atrapadas en la red biopolimérica, afectando la viabilidad y la eficiencia de la película para liberar a la bacteria.

Tabla I. Prueba de viabilidad de *Pediococcus pentosaceus* en las películas comestibles de caseinato con iota, kappa o lambda

	Iota		Kappa		Lambda	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
UFC/cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>6</sup>	1 x 10 <sup>7</sup>	8 x 10 <sup>6</sup>

En la Figura 1 se muestran los halos de inhibición teniendo un control (película sin BAL). En la Tabla II esta Para *L. innocua* y *E. coli* se observan los halos de inhibición en los agares Mueller-Hilton y BHI. podemos ver el comparativo de las temperaturas a las que se manejaron los experimentos en donde notamos una ligera diferencia entre cada temperatura y los halos de inhibición, en el caso de la película elaborada con iota carragenina, probada para *L. innocua* pre-acondicionada a 25°C fueron mayores los halos de inhibición en comparación con el pre-acondicionamiento a 4 °C, de manera inversa, la inhibición que se mostró para *E. coli* fue mayor a 4 °C que a 25 °C. En el caso de kappa carragenina inhibiendo *L. innocua*, fue mayor en el pre-acondicionamiento a 4 °C y para *E. coli* las dos temperaturas mostraron los mismos halos de inhibición. De este modo, lambda no mostro una diferencia en las dos etapas de temperatura de pre-acondicionamiento en la inhibición para *L. innocua* y *E. coli*. Para las tres películas no se mostró ningún tipo de inhibición para *S. aureus*.

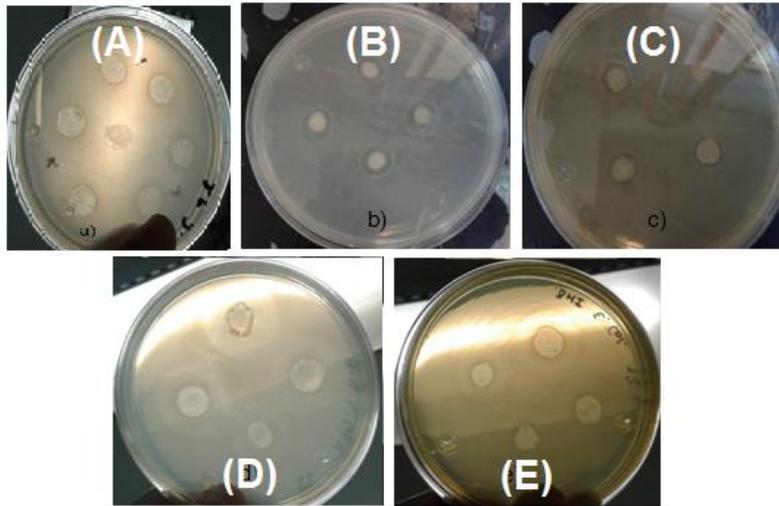


Figura 1. Discos de películas comestibles con halos de inhibición: a) control; b) agar Mueller-Hilton inoculado con *L. innocua*; c) agar BHI inoculado con *L. innocua*; d) agar Mueller-Hilton inoculado con *E. coli*; e) agar BHI inoculado con *E. coli*.

Tabla II. Prueba de eficiencia antimicrobiana en las películas de iota, kappa o lambda.

Patógeno a inhibir	Diámetro del halo de inhibición (mm) con agar Mueller-Hilton					
	iota		Kappa		Lambda	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
<i>L. innocua</i>	1.4	1.6	1.8	1.4	1.4	1.4
<i>E. coli</i>	2.2	2	2.2	2.2	2	2
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0
Patógeno a inhibir	Diámetro del halo de inhibición (mm) con agar Cerebro Corazón					
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
<i>L. innocua</i>	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.4
<i>E. coli</i>	1.8	1.4	1.4	1.8	1.4	2

*S. aureus*            0            0            0            0            0            0

## DISCUSIÓN

Las bacteriocinas son las proteínas tóxicas que las bacterias sintetizan a inhibir el crecimiento de otras bacterias similares o cerca. Así, las películas que contienen mayores cantidades de bacteriocinas tendrán más actividad bactericida.

En las películas, la diferente naturaleza fisicoquímica de las proteínas y polisacáridos puede afectar a la viabilidad y actividad metabólica de la BAL por lo que su eficacia antibacteriana en las películas es un aspecto importante a considerar en el establecimiento de interacciones específicas entre la matriz polimérica (proteína o polisacáridos), BAL y su influencia en la producción de bacteriocinas, que pueden afectar a la actividad antimicrobiana. Cuando se elaboran películas comestibles que contienen sustancias antimicrobianas, se espera que tengan la capacidad de migrar a la superficie del alimento o permanecer retenidas en la película. Ambos fenómenos determinan la efectividad antimicrobiana de una película y se presentan en compuestos antimicrobianos tanto sintéticos como naturales. La migración dependerá de las interacciones electrostáticas entre el antimicrobiano y las cadenas del polímero, los fenómenos de osmosis iónica, los posibles cambios estructurales inducidos por la presencia del agente antimicrobiano y las condiciones ambientales a las que se exponen las películas elaboradas (Cha y Chinnan, 2004). La cohesión y adhesión está relacionada con la estructura, composición química, peso molecular, regularidad de las cadenas estructurales, ramificaciones, polaridad y distribución de grupos polares de la cadena polimérica. La cohesión y rigidez de las películas se ven favorecidas por un orden superior de las cadenas. Los grupos polares disminuyen la fusión molecular pero promueven la formación de cadenas laterales ordenadas. La desnaturalización y algunos aditivos que promueven enlaces cruzados se utilizan para tener un orden molecular. La funcionalidad del polímero también está relacionada con las características del solvente. La solvatación del polímero y la extensión de la cadena polimérica pueden producir películas más eficientes. El grado de cohesión dependerá de la estructura polimérica, el solvente utilizado, la temperatura y la presencia de plastificante (Guilbert et al., 1996; Srinivasa et al., 2007).

La difusión de los antimicrobianos en una película comestible estuvieron influenciada por el tipo de polímero, plastificante y proceso de elaboración; las características del alimento a recubrir, como pH y actividad de agua; y las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento (Lin y Zhao, 2007). Los diferentes agentes microbianos que son incorporados a las películas, por sus diversas características químicas, forman parte de la estructura de la película, mediante la interacción con el biopolímero y el plastificante. Este fenómeno impide que el compuesto antimicrobiano migre (Cha y Chinnan, 2004; Min y Krochta, 2005)

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demostraron claramente que la adición de las células bacterianas en la matriz de la película caseinato de sodio no alteró ninguna de las propiedades fisicoquímicas de las películas. La adición de las diferentes carrageninas (iota, kappa, lambda) en las películas de proteínas no interfirieron de una manera significativa en la viabilidad de *P. pentosaceus* en la matriz de caseinato de sodio, incluso cuando se almacenan a temperatura ambiente. El uso del antimicrobiano en las películas activas contra *L. innocua*, *E. coli* y *S. aureus*, inoculadas en medios de laboratorio y un sistema de modelo de alimento y almacenado bajo condiciones constantes de temperaturas, dieron como resultado una inhibición significativa de los patógenos, en comparación con las muestras control. Los resultados nos indicaron que las películas basadas en biopolímeros que contienen una cepa de *P. pentosaceus* pueden ser utilizadas como tecnología de envasado alternativa eficaz para mejorar la seguridad alimentaria. La incorporación de las células microbianas de LAB no alteró notablemente las propiedades de tracción ni fisicoquímicas. Independientemente del polímero y la cepa utilizada en la película de sodio caseinato adicionadas con las diferentes carrageninas y glicerol, mostraron ser portadores eficaces de células bacterianas de *P. pentosaceus*, que se utilizan como agentes antimicrobianos. En efecto, las películas con cultivos bioactivos presentan interesante actividad antilisterial y frente a *E. coli*, no así para el caso de *S. aureus* donde no se encontró ningún tipo de inhibición. Los mejores resultados se obtuvieron para las películas de kappa, seguidas de iota y finalmente lambda probadas en agar Mueller-Hilton.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayala-Valencia G, LC de Oliveira-Vercik, R Ferrari, A Vercik. 2013. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using water-soluble starch and its antibacterial activity on *Staphylococcus aureus*. *Starch-Stärke* 65: 931-937.
- Cha DS, MS Chinnan. 2004. Biopolymer-Based antimicrobial packaging: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 223-237.
- Guilbert A, N Gontard, LGM Gorris. 1996. Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT-Food Science and Technology* 29: 10-17.
- Lin D, Y Zhao. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 60-75.
- Maizura M, A Fazilah, MH Norziah, AA Karim. 2007. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch-alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science* 72: C324-C330.
- Min S, JM Krochta. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science* 70: M87-M94.