

12

PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON EFECTO ANTIMICROBIANO

Rosa M. Raybaudi-Massilia,^{1*} María S. Tapia,¹ Jonathan Mosqueda-Melgar¹

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 materiales de empaque amigables con el ambiente, ha impulsando a la industria de alimentos y a los investigadores a desarrollar nuevas estrategias para su procesamiento, manipulación y empaquetado. En tal sentido, las películas y recubrimientos elaborados con materiales biodegradables y comestibles, con efecto antimicrobiano gracias a sus características propias, o a la incorporación de agentes antimicrobianos tradicionales o naturales, han resultado ser una alternativa novedosa para la extensión de la vida útil, el mantenimiento de propiedades físicas, químicas y sensoriales, y la inocuidad de los alimentos recubiertos. Ésta sirve como una barrera contra la pérdida de humedad y el paso del oxígeno, 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. Además, esta alternativa tiene como ventaja su costo-beneficio. En el presente capítulo se revisan diversos agentes antimicrobianos incorporados en películas y recubrimientos y su efecto sobre diferentes matrices alimentarias. Además, se discuten los factores que se deben considerar para su desarrollo, así como el estatus regulatorio.

Palabras clave: películas, recubrimientos, antimicrobianos, empaquetamiento.

| Introducción

Los cambios de hábitos en las dietas de los consumidores debido a los cambios en los patrones de vida de la sociedad moderna, nos han llevado a una mayor adquisición

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela, Lomas de Bello Monte, Calle Suapure, Caracas, Venezuela. Código Postal 1041A, Apartado Postal 47097. Tel: 0058-212-753-44-03/0058-212-753-56-84; Fax: 0058-212-753-38-71.

* Correo electrónico: <rosa.raybaudi@ciens.ucv.ve>, <raybaudir@hotmail.com>.

de productos listos para comer (*ready to eat*) que proporcionen los valores nutritivos necesarios para el funcionamiento adecuado del organismo, que sean más seguros microbiológicamente, que vengan en empaques más prácticos y amigables con el medio ambiente, y que cuenten con una vida útil más larga (Cagri, Ustunol y Ryser, 2004). Tales retos significan un desafío para la industria de alimentos tanto en lo tecnológico (desarrollo de nuevas estrategias de procesamiento, manipulación y empaquetamiento) como en lo logístico (gestión, mercadeo y sistemas de distribución adecuados), ya que los alimentos listos-para-comer requieren de una mayor manipulación durante su proceso, y por ende, son más susceptibles al ataque de microorganismos deteriorativos y patógenos; los cuales pudieran causar problemas de salud pública si estos alimentos no son procesados, manipulados y distribuidos adecuadamente (Beuchat, 1996; Díaz-Cinco, Acedo-Felix y García-Galaz, 2005). Por tanto, un apropiado tratamiento, empaquetamiento y almacenaje, pudiera evitar la contaminación de estos productos, y por consiguiente, conseguir un aumento de su vida útil (Cagri, Ustunol y Ryser, 2004).

La industria de alimentos ha venido aplicando tradicionalmente varias estrategias (enfriamiento, deshidratación, acidificación, empaquetamiento en atmósferas modificadas, fermentación y/o el uso de antimicrobianos) para controlar el crecimiento microbiano de alimentos tales como: frutas y vegetales frescos cortados, embutidos y quesos rebanados, y productos cárnicos listos para cocinar (Davidson y Taylor, 2007). Sin embargo, nuevas técnicas de preservación están siendo estudiadas y aplicadas con éxito sobre estos productos. Una de esas técnicas es la aplicación de películas y recubrimientos comestibles con sustancias antimicrobianas y antioxidantes añadidas.

La industria de alimentos tiene a su disposición un amplio rango de materiales de empaque de origen no comestible, tales como las películas de polipropileno y polietileno, las cuales pueden proteger a los alimentos de la contaminación ambiental, pero presentan la desventaja de que son materiales no biodegradables. Por tal motivo, las películas y recubrimientos comestibles a base de proteínas, lípidos y polisacáridos, están siendo estudiadas y aplicadas a productos de alimentos como un potencial material de empaque que puede actuar como una barrera contra el vapor de agua, gases y compuestos volátiles. Además, pueden servir como transportadores de sustancias antimicrobianas, antioxidantes, saborizantes y vitaminas, las cuales pueden aumentar la calidad, inocuidad, funcionalidad y vida útil del producto, además de ser empaques amigables con el ambiente (Gennadios, Hanna y Kurt, 1997; Cagri, Ustunol y Ryser, 2004, Lin y Zhao, 2007; Rojas-Graü, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). En este capítulo nos enfocaremos en aquellas películas y recubrimientos comestibles a base de proteínas, lípidos y polisacáridos con sustancias antimicrobianas añadidas o con actividad antimicrobiana propia, aplicadas sobre alimentos listos para comer.

| Agentes antimicrobianos incorporados en películas y recubrimientos comestibles

Los antimicrobianos de alimentos son compuestos o sustancias químicas que pueden retardar el crecimiento o causar la muerte microbiana cuando éstos son incorporados en una matriz de alimentos (Davidson y Zivanovic, 2003). Los principales blancos de acción de los antimicrobianos son los microorganismos patógenos productores de toxinas o causantes de infecciones y microorganismos deteriorativos, cuyos productos finales metabólicos causan olores y sabores desagradables, problemas de textura y decoloración del producto (Davidson y Taylor, 2007).

La clasificación de los antimicrobianos en grupos específicos no es fácil, ya que algunos de los considerados tradicionales y/o sintéticos también se pueden encontrar en forma natural en los alimentos. Sin embargo, actualmente son clasificados por algunos autores como tradicionales y naturales (compuestos de origen natural) tomando en cuenta ciertas consideraciones (Davidson y Taylor, 2007; Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009).

Los antimicrobianos son llamados tradicionales cuando: 1) han sido usados por muchos años, 2) han sido aprobados por muchos países para inclusión como antimicrobianos en alimentos, o 3) han sido producidos por síntesis química. Sin embargo, esta clasificación no implica que preservativos tradicionales o sintéticos sean más efectivos desde un punto de vista microbiológico que uno de origen natural, o viceversa.

No obstante, los agentes antimicrobianos naturales de origen de planta, animal y microbiano están siendo preferidos hoy en día por los consumidores, debido a la activa promoción de estas sustancias como aditivos “no perjudiciales” para el organismo y, por tanto, son “más saludables” que las sustancias químicas no naturales o sintéticas.

La incorporación de agentes antimicrobianos tales como: ácidos orgánicos, bacteriocinas, enzimas, extractos de plantas y polisacáridos en películas y recubrimientos comestibles, ha demostrado ser una alternativa novedosa para retardar o inhibir el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos en un amplio rango de alimentos, por lo que su aplicación es cada vez más frecuente (tabla 1).

Agentes antimicrobianos tradicionales

Los ácidos orgánicos son los agentes preservativos más tradicionalmente o comúnmente usados en la industria de alimentos. Algunos de estos ácidos orgánicos tales como: cítrico, málico, láurico, propiónico, tartárico, benzoico, sórbico y láctico, han sido incorporados en películas y recubrimientos comestibles, de manera directa o en forma de sales. Su

TABLA 1. AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS EN PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Agente antimicrobiano	Material comestible base		Referencia
	Película	Recubrimiento	
Ácido málico		Alginato, Prot. suero de leche	Gadang, Hettiarachchy, Johnson y Owens, 2008; Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Meigar, Martín-Belloso, 2008; Raybaudi-Massilia, Rojas-Graü, Mosqueda-Meigar y Martín-Belloso, 2008
Ácido acético	Quitosano		Begin y Van Calsteren, 1999;
Ácido fórmico	Quitosano		Begin y Van Calsteren, 1999;
Ácido láctico	Quitosano		Begin y Van Calsteren, 1999; Ye, Neetoo y Chen, 2008
Ácido láurico	Prot. soya		Dawson, Carl, Acton y Han, 2007
Ácido propiónico	Zeína,	Celulosa	Janes, Kooshesh y Johnson, 2002; Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, Del Río y Palou, 2009
Sorbato de potasio	Quitosano	Celulosa	Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Ye, Neetoo y Chen, 2008; Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, Del Río y Palou, 2009
Benzoato de sodio	Quitosano	Celulosa	Ye, Neetoo y Chen, 2008; Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, Del Río y Palou, 2009
Quitosano	Quitosano, Metil-celulosa	Quitosano	Begin y Van Calsteren, 1999; Pen y Jiang, 2003; Devlieghere, Vermeulen y Debevere, 2004; Dong, Cheng, Tan y otros, 2004; González-Aguilar, Monroy-García, Goycoolea-Valencia y otros, 2005; 2009; Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Sebti, Martial-Gros, Carnet-Pantiez y otros, 2005; Chien, Sheu y Yang, 2007; Sangsuwan, Rattapanone y Rachtanapun, 2008; Ye, Neetoo y Chen, 2008; Dutta, Tripathi, Mehrotra y Dutta, 2009; Vargas, Chiralt, Albers y González-Martínez, 2009

Natural o Nuevo	Enzimas (Lisozima y Ovotransferrina)	Quitosano, Alginato, Carragenina	Quitosano	Cha, Choi, Chinnan y Park, 2002; Seol, Lim, Jang y otros, 2009
	Aceites esenciales	Quitosano, Alginato; Prot. soya	Alginato, Puré de manzana	Pranoto, Salokhe y Rakshit, 2005; Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Oussalah, Caillet y Lacroix, 2006; Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros, 2007; Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Martín-Belloso, 2008; Raybaudi-Massilia, Rojas-Graü, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso, 2008
	Bacteriocinas (Nisin, Enterocinas y Pediocinas)	Quitosano, Alginato, Carragenina, Prot. soya, Celulosa, Zeína	Prot. suero de leche	Cha, Choi, Chinnan y Park, 2002; Janes, Kooshesh y Johnson, 2002; Franklin, Cooksey y Getty, 2004; Pranoto, Salokhe y Rakshit, 2005; Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Dawson, Carl, Acton y Han, 2007; Millette, Le Tien, Smoragiewicz y Lacroix, 2007; Marcós, Aymerich, Monfort y Garriga, 2008; Gadang, Hettiarachchy, Johnson y Owens, 2008; Santiago-Silva, Soares, Nóbrega y otros, 2009
	Extracto de semilla de uva y toronja	Alginato, Carragenina, gelatina	Prot. suero de leche, Prot. soya	Cha, Choi, Chinnan y Park, 2002; Theivendran, Hettiarachchy y Johnson, 2006; Gadang, Hettiarachchy, Johnson y Owens, 2008; Hong, Lim y Song, 2009
	Extracto de té verde	Gelatina	Prot. Soya	Theivendran, Hettiarachchy y Johnson, 2006; Hong, Lim y Song, 2009
	Especies en polvo	Caseinato, Prot. suero de leche		Outtara, Giroux, Yefsah y otros, 2002
	Vanillina		Alginato, Celulosa, Puré de manzana, Quitosano	Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros, 2007; Sangsuwan, Rattanapanone y Rachtanapun, 2008

espectro de acción antimicrobiana es muy amplio, va desde una disminución directa del pH del sustrato o medio de crecimiento debido a un aumento de la concentración de protones, hasta la alteración de la permeabilidad de la membrana celular debido a la interacción con proteínas de la membrana, las cuales afectan su funcionamiento (Davidson y Taylor, 2007). Además, la forma no disociada de los ácidos orgánicos débiles puede penetrar la bicapa lipídica de la membrana celular de los microorganismos con mayor facilidad, y una vez dentro, la molécula de ácido es forzada a disociarse en aniones y protones cargados, debido al pH cercano a la neutralidad del citoplasma celular, y causar inactivación celular por daño en la señalización celular, transporte activo y material genético (Stratford y Eklund, 2003).

Agentes antimicrobianos naturales

Dependiendo de su origen, los antimicrobianos naturales pueden ser clasificados como: vegetal, animal o microbiano.

ORIGEN VEGETAL

Los antimicrobianos de origen vegetal son todos aquellos compuestos que están presentes en forma natural en las diferentes partes de las plantas, como tallos, cortezas, raíces, flores y frutos, que tienen un efecto inhibitorio o bactericida sobre los microorganismos. Dentro de los compuestos de este grupo que han sido aplicados a los alimentos a través de películas y coberturas podemos incluir a los aceites esenciales, especias y otros extractos.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos provenientes de las partes de las plantas (flores, semillas, hojas, ramas, hierbas, madera, frutos y raíces), constituidos por una compleja mezcla de compuestos como terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres (Burt, 2004; Ayala-Zavala, Villegas-Ochoa, Cuamea-Navarro, 2005), que pueden ser obtenidos por fermentación, extracción o destilación. Los aceites esenciales y sus componentes han sido utilizados desde la antigüedad como saborizantes en alimentos, pero recientemente, algunos de ellos como los extraídos de orégano, canela, clavo, hierba de limón, palmarosa, timo, ajedrea, pimienta, ajo y algunos de sus compuestos activos como carvacrol, cinamaldehído, eugenol, citral, geraniol y timol, han sido

incorporados como agentes antimicrobianos en películas y recubrimientos comestibles (Oussalah, Caillet, Salmiéri y otros, 2004 y Oussalah, Caillet, Salmiéri y otros, 2006; Pranoto, Salokhe y Rakshit, 2005 y Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Martín-Belloso, 2008, Raybaudi-Massilia, Rojas-Graü, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso, 2008 y Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso 2009; Rojas-Graü, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). No existe un único mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre los microorganismos, debido a que están constituidos por múltiples compuestos químicos que tienen diferentes blancos de acción en la célula microbiana (Burt, 2004). Nychas, Skandamis y Tassou (2003), Burt (2004) y Oussalah, Caillet y Lacroix (2006) indicaron que los aceites esenciales pueden causar degradación de la pared celular, daños a la membrana citoplasmática y a las proteínas de membrana, favorecen la salida del contenido celular, coagulación del citoplasma y una disminución de la fuerza protón motriz. Nychas, Skandamis y Tassou (2003) señalaron que el modo de acción es dependiente de la concentración de aceite esencial, indicando que bajas concentraciones inhiben las enzimas asociadas a la producción de energía, mientras que altas concentraciones pueden causar la precipitación de las proteínas.

Vanillina

La vanillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es un aldehído fenólico presente en los granos de la vainilla que ha sido utilizado en recubrimientos comestibles como saborizante y antimicrobiano (Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros, 2007). La vanillina es efectiva contra microorganismos Gram (+), Gram (-), mohos y levaduras (Walton, Mayer y Narbard, 2003), siendo más activa contra mohos y bacterias Gram (+) no lácticas (Davidson y Taylor, 2007). Basado en estudios científicos, la actividad inhibitoria o bactericida de la vanillina radica principalmente en su capacidad para afectar de forma negativa la integridad de la membrana citoplasmática, con pérdida de gradientes iónicos, desequilibrando la homeostasis del pH e inhibiendo la actividad respiratoria (Fitzgerald, Stratford, Gasson y otros, 2004).

Extracto de té verde, semilla de uva y toronja

Los extractos de té verde (ETV), de semilla de uva (ESU) y semilla de toronja (EST), han sido adicionados también a películas comestibles y son de gran interés debido a su alto contenido de componentes fenólicos. En el caso del ETV, los polifenoles, y en particular

los flavonoides tales como las catequinas, son los componentes más abundantes (Almanjo, Carbó, López-Jiménez y Gordon, 2008), siendo muchas de sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes atribuidas a esa fracción de catequinas como: epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), gallato de epigallocatequina (EGCg), gallato de epicatequina (ECg), gallato de catequina (Cg) y gallato de galocatequina (GCg) (Frei y Higdon, 2003). Así pues, Taylor, Hamilton-Miller y Stapleton (2005) señalaron que estudios conducidos en los últimos 20 años han demostrado que las catequinas polifenólicas del té verde, en particular la EGCg y ECg, pueden inhibir el crecimiento microbiano de un amplio rango de microorganismos Gram (+) y Gram (-). Shimamura, Zao y Hu (2007) indicaron que la actividad antimicrobiana de estas dos catequinas puede ser atribuida principalmente a la fracción galoil (g), la cual está ausente en EC y EGC. Asimismo, estos autores reportaron que EGCg puede enlazarse directamente a la capa de peptidoglicano e inducir su precipitación por interferir con su biosíntesis, lo que hace que las bacterias Gram (+) sean más sensibles que las Gram (-), debido a la presencia de una membrana externa que sirve como barrera de sustancias antibacterianas. De este modo, la función fisiológica de la membrana externa y la baja afinidad entre la EGCg y los lipopolisacáridos de la membrana externa son los que limitan el enlace de la EGCg a la capa de peptidoglicano, y en consecuencia, un menor efecto antimicrobiano es observado contra las bacterias Gram (-) (Shimamura, Zao y Hu, 2007).

Los ESU y EST son también fuentes ricas en compuestos fenólicos monoméricos, tales como catequinas, EC y ECG, y procianidinas dímeras, trímeras y tetrámeras, las cuales pueden actuar como agentes antivirales y antimutagénicos (Saito, Hosoyama, Ariga y otros, 1998). Los ESU y EST son efectivos principalmente contra las bacterias Gram (+), siendo el ácido gálico su principal componente activo (Jayaprakasha, Selvi y Sakariah, 2003). Los mecanismos de acción antimicrobiana de los ESU y EST propuestos, indican que los compuestos fenólicos y procianidinas presentes en esas fracciones pueden actuar sobre las proteínas de membrana de las células, provocando la salida de una serie de compuestos desde el interior de las células, originando pérdidas de K^+ , ácido glutámico, ARN intracelular, entre otros, además de una alteración en la composición de ácidos grasos de la membrana (Rozès y Peres, 1998; Hegggers, Cottingham, Gusman y otros, 2002).

ORIGEN ANIMAL

Dentro de los antimicrobianos de origen animal incorporados en películas y recubrimientos comestibles encontramos las enzimas, como lisozima y ovotransferrina, y el quitosano, como un polisacárido.

Enzimas

La lisozima (peptidoglicano N-acetilmuramoyl hidrolasa EC 3.2.1.17) es una enzima que está presente en huevos de aves, leche de mamíferos, lágrimas y otras secreciones, insectos y peces, que puede catalizar la hidrólisis del enlace glucosídico α -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina de la capa de peptidoglicano de la pared celular de las bacterias (Davidson y Taylor, 2007). Esta enzima resulta más efectiva contra bacterias Gram (+) que contra bacterias Gram (-), debido probablemente a que la capa de peptidoglicano de la pared celular está más expuesta. En la actualidad, es clasificada como un antimicrobiano tradicional, ya que ha sido aprobada por diferentes países para su uso en alimentos (Davidson y Taylor, 2007).

Por su parte, la ovotransferrina (conocida comúnmente como “conalbúmina”), la segunda proteína más importante presente en la clara de huevo, es una glicoproteína enlazada al hierro, perteneciente a la familia de las transferrinas, que transporta y secuestra el ión hierro (Fe^{+3}) (Ko, Mendoza y Ahn, 2008). La ovotransferrina inhibe varios microorganismos Gram (+), Gram (-) y levaduras, incluyendo: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis y *Candida*. No obstante, esta enzima es más efectiva en bacterias Gram (+) (Davidson y Taylor, 2007; Ko, Mendoza y Ahn, 2008). El mecanismo de acción antimicrobiano de la ovotransferrina no está aún totalmente elucidado; sin embargo, se pensaba que tenía capacidad de enlazarse al Fe^{+3} , por ser el principal mecanismo de acción de la ovotransferrina. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la principal causa de su acción antimicrobiana se debe a las interacciones directas de la ovotransferrina con la superficie bacteriana. Este hecho se produce por un aumento en la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram (-), la cual subsecuentemente puede causar daños a las funciones biológicas de la membrana citoplasmática (Ibrahim, Sugimoto y Aoki, 2000).

Quitosano

Otro tipo de antimicrobiano de origen animal utilizado en recubrimientos y películas comestibles es el quitosano. Éste es un hetero-polisacárido binario lineal compuesto de N-acetil-glucosamina y glucosamina asociado al enlace β -(1,4), el cual es obtenido comercialmente por deacetilación de la quitina, un constituyente abundante del exoesqueleto de crustáceos, insectos y hongos (Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Sebti, Martial-Gros, Carnet-Pantiez y otros, 2005). Este compuesto tiene un gran potencial para un amplio rango de aplicaciones, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana, no toxicidad y sus versátiles propiedades físicas y químicas (Dutta, Tripathi,

Mehrotra y Dutta, 2009). El mecanismo de acción antimicrobiana de la quitina, el quitosano y sus derivados aún no se conoce del todo; sin embargo, estudios realizados por Liu, Du, Wang y Sun (2004) demostraron que el quitosano incrementó la permeabilidad de la membrana externa e interna de las células bacterianas al punto de ruptura, con la subsecuente salida del contenido citoplasmático. Los autores atribuyen este daño o efecto bactericida a la interacción electrostática entre los grupos aminos (NH_3^+) cargados positivamente del quitosano y los grupos fosforilos (PO_3^-) de los componentes fosfolipídicos de las membranas celulares, los cuales están cargados negativamente.

Origen microbiano

Dentro de los compuestos antimicrobianos de origen microbiano incorporados en películas y recubrimientos comestibles, encontramos las bacteriocinas como la nisina, pediocina y enterocina.

Las bacteriocinas, las cuales son péptidos o proteínas producidas por diferentes microorganismos, son compuestos que tienen un efecto inhibitorio o bactericida sobre otros. Las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas comprenden dos grandes grupos: el primero donde encontramos la lactacina y la lactocina (producidas por *Lactobacillus* spp.), y el segundo donde encontramos la nisina (producida por *Lactococcus lactis lactis*) y pediocina (producida por *Pediococcus acidilactici*) (Marugg, 1991; Davidson y Zivanovic, 2003). Otro grupo comúnmente estudiado de bacteriocinas son las enterocinas, las cuales son producidas por especies del género *Enterococcus*. De estas bacteriocinas, la más estudiada y aplicada ha sido la nisina, un pequeño péptido de 34 aminoácidos estable al calor, el cual tiene un efecto bactericida contra bacterias Gram (+) y esporostática contra sus esporas, pero inefectiva contra bacterias Gram (-) (Helandier y Mattila-Sandholm, 2000). El mecanismo de acción de la nisina involucra la interacción con precursores del peptidoglicano y formación de poros transitorios en la membrana citoplasmática del microorganismo blanco (Abee, Rombouts, Hugenholtz y otros, 1994), que producen una disminución de la fuerza protón motriz y una pérdida de iones celulares, aminoácidos y ATP (Crandall y Montville, 1998). Además, la nisina puede interferir en la biosíntesis de la pared celular; sin embargo, algunos investigadores han indicado que esto puede ser simplemente una consecuencia de la pérdida de energía y la despolarización de la membrana resultante de la formación de poros e inducción de autólisis (Thomas, Clarkson y Delves-Broughton, 2000).

Por tanto, la baja efectividad antimicrobiana de la nisina contra bacterias Gram (-) es debida a la membrana externa protectora, que cubre la membrana citoplasmática, y

a la capa de peptidoglicano de las células Gram (-) que es más delgada. Esta membrana externa contiene fosfoglicéridos en su interior y moléculas de lipopolisacáridos (LPS) en su exterior, la cual crea una superficie hidrófila (Nikaido, 1996), y en consecuencia, una barrera de penetración contra sustancias hidrófobas y macromoléculas. En este caso, la nisin, como macromolécula hidrófoba, es incapaz de atravesar la membrana externa de bacterias Gram (-), y por ello no puede alcanzar su mecanismo de acción principal (Heller y Mattila-Sandholm, 2000).

Por otra parte, las pediocinas y enterocinas no han sido bien caracterizadas, y su modo de acción sobre los microorganismos aún no está claro del todo; sin embargo, su actividad antimicrobiana ha sido demostrada, ya que se ha reportado una fuerte actividad contra microorganismos patógenos (Sobrinó López y Martín-Belloso 2008; Santiago-Silva, Soares, Nóbrega y otros, 2009). En este sentido, Buhnia, Johnson, Ray y Kalchayanand (2008) indicaron que el posible mecanismo de acción de la pediocina con relación a la pérdida de la viabilidad de las células sensibles se debe a que, inicialmente, la pediocina se une a los receptores no específicos (probablemente ácidos lipoteicoicos), cuando los sitios no específicos están saturados, las moléculas de pediocina se enlazan a los receptores específicos, y logran producir cambios en la integridad de la membrana; en consecuencia, las células pierden los iones de potasio y otras moléculas pequeñas, además de inducirse pérdida en su capacidad para multiplicarse. En algunas cepas, la membrana celular también puede perder la integridad estructural y producir lisis. En las bacterias Gram (+) resistentes los receptores específicos, son ausentes o no están disponibles para enlazarse, y en la bacterias Gram (-) tanto los receptores no específicos como los específicos para pediocina están ausentes. Por su parte, Krxmer y Brandis (1975) indicaron que las enterocinas pueden inhibir la síntesis de proteínas, ADN y ARN, además de inhibir la acumulación de isoleucina e inducir la salida de isoleucina ya acumulada. Estos efectos en los procesos bioquímicos pueden indicar una inhibición del suministro de energía o una alteración de la permeabilidad de la membrana.

| Factores a considerar para la selección de antimicrobianos

La efectividad de los antimicrobianos depende de varios factores asociados al alimento, a las condiciones de almacenamiento, a su manipulación, y al tipo de microorganismo a controlar. Por ende, la preservación de los alimentos se logra mejor cuando son conocidos y tomados en cuenta los siguientes factores: los microorganismos a hacer inhibidos, el tipo de antimicrobiano y su concentración, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, el pH

del alimento y su capacidad amortiguadora, y la presencia de otros agentes que puedan afectar su vida útil (Davidson y Taylor, 2007).

De acuerdo con Gould (1989), los factores que pueden afectar la actividad de los antimicrobianos se pueden clasificar en: microbianos, intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento. Los factores microbianos incluyen la resistencia inherente (células vegetativas vs. esporas; diferencias entre cepas), número inicial y tasa de crecimiento, interacción con otros microorganismos (competencia, antagonismo), composición celular (reacción Gram), estatus celular (lesionadas), y la capacidad de formar bio-películas. Los factores intrínsecos que afectan la actividad antimicrobiana son aquellas asociadas con el alimento e incluyen nutrientes, pH, capacidad amortiguadora, potencial de óxido reducción y actividad de agua. Los extrínsecos que afectan la actividad antimicrobiana incluyen la temperatura de almacenamiento, la atmósfera y humedad relativa. Además, el tiempo de almacenamiento es un factor importante. Los factores de procesamiento incluyen la composición de alimentos, reemplazo de la micro-flora nativa, cambios en la población microbiana y cambios en la micro-estructura del alimento.

| Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las coberturas y películas puede ser determinada a través de dos métodos: dilución y difusión por discos.

Método de dilución

El método de dilución consiste en colocar diferentes concentraciones del antimicrobiano en un medio líquido o sólido y luego inocularlo con el microorganismo en estudio. Así, por ejemplo, Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de una solución formadora de películas comestibles a base de alginato y puré de manzana conteniendo aceites esenciales de orégano, canela y hierba de limón y/o sus compuestos activos: carvacrol, cinamaldehído y citral contra *E. coli* O157:H7. Los autores colocaron la solución formadora de película diluida con solución salina (pH 3.3) con los aceites esenciales o sus compuestos activos en pocillos de una microplaca para luego inocularlos con *E. coli* O157: H7 y determinar la concentración de cada compuesto capaz de reducir 50% la población del microorganismo, lo que los autores denominaron actividad bactericida 50 (BA50).

Método de difusión por discos

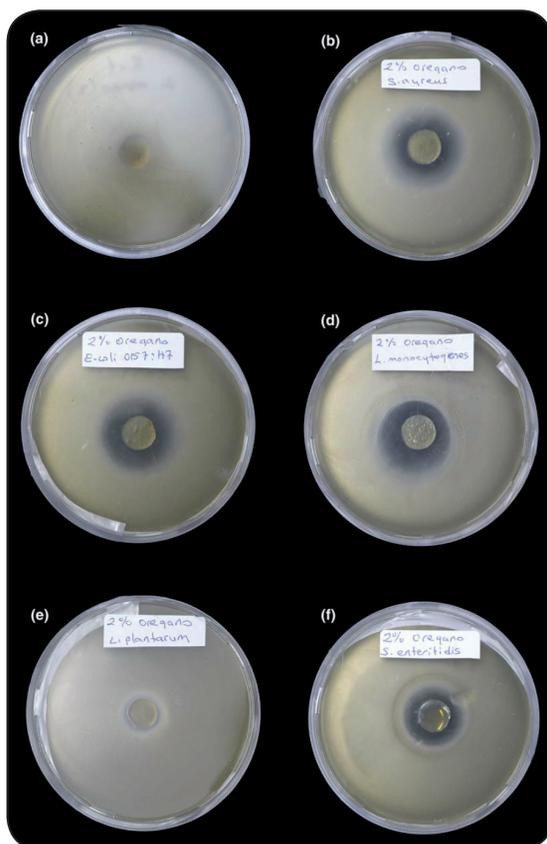
El método de difusión por discos consiste en colocar discos de papel de filtro o discos obtenidos de la película preformada conteniendo diferentes concentraciones de la(s) sustancia(s) antimicrobiana(s) a evaluar sobre placas con agar previamente inoculadas con el microorganismo que se quiere estudiar (figura 1). Padgett, Han y Dawson (1998), Cagri, Ustonol y Ryser (2001), Cha, Choi, Chinnan y Park (2002), Seydim y Sarikus (2006) y Rojas-Graü, Avena-Bustillo, Friedman y otros (2006) evaluaron la actividad antimicrobiana de películas por este método, y encontraron que puede ser una buena alternativa para evaluar antimicrobianos a diferentes concentraciones, ya que permite al investigador hacer una selección del antimicrobiano y concentración ideal, basado en la detección y medición de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de los discos.

| Películas y recubrimientos comestibles con efecto antimicrobiano

El objetivo principal del empaqueo de alimentos es preservar la calidad e inocuidad de éstos, desde el momento de su manufactura hasta el momento de su consumo. Así pues, el material de empaque funciona como una barrera al paso de agentes contaminantes hacia el producto. Los materiales de empaques mejor conocidos y aplicados que cumplen con este objetivo en la industria de alimentos son el polietileno o los materiales a base de copolímeros, los cuales han sido utilizados por la industria de alimentos por más de 50 años (Cutter, 2006). No obstante, una de las limitantes de estos materiales es que no son biodegradables, lo que significa que se convierten en una fuente de contaminación para el ambiente. Esto ha motivado a los investigadores a desarrollar empaques que sean elaborados con materiales biodegradables que a su vez pueden ser comestibles, disminuyendo la contaminación ambiental y garantizando que el empaque cumpla el objetivo principal de protección del alimento.

Una alternativa novedosa de empaqueo ha sido el uso de películas comestibles, las cuales pueden ofrecer propiedades de barrera y limitar el paso del oxígeno previniendo la contaminación y el deterioro del producto. Las películas comestibles pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos por el solo hecho de limitar el paso del oxígeno, o por ser elaboradas a base de materiales con propiedades antimicrobianas como el quitosano. Además, éstos pueden servir como transportadores de sustancias antimicrobianas

FIGURA 1. FIGURA REPRESENTATIVA DE ZONAS INHIBIDAS DE DISCOS DE PELÍCULA DE SUERO DE PROTEÍNA DE LECHE CONTENIENDO ACEITE DE ESENCIAL DE ORÉGANO AL 2% Y COMPARADO CONTRA EL CONTROL. (A) CONTROL, (B) *S. AUREUS*, (C) *E. COLI* O157:H7, (D) *L. MONOCYTOGENES*, (E) *L. PLANTARUM* Y (F) *S. ENTERITIDIS*



Fuente: tomada de Seydim y Sarikus (2006).

de origen natural o sintético (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). Una de las ventajas de incorporar los agentes antimicrobianos a las películas es la reducción en la velocidad de difusión de estos compuestos en el alimento, garantizando así su acción por más tiempo en la superficie, donde por lo general ocurre la mayor contaminación (Cagri, Ustunol y Ryser, 2004).

Aplicadas a productos cárnicos

La contaminación de los productos cárnicos principalmente comienza por la superficie debido a la carga microbiana proveniente de la manipulación inadecuada, maquinarias de procesamiento y empaclado. Las películas antimicrobianas pueden ser utilizadas para prevenir la contaminación de la carne y productos cárnicos durante el almacenamiento en refrigeración, pero también pueden ser utilizadas para inhibir el crecimiento microbiano en la superficie de los productos frescos procesados y extender así su vida útil (Cagri, Ustonol y Ryser, 2004).

De acuerdo con la bibliografía, las películas antimicrobianas aplicadas a productos cárnicos han sido elaboradas principalmente a base de polisacáridos (alginato, celulosa, metil-celulosa, e hidroxipropilmetilcelulosa) y proteínas (zeína, caseinato, suero de leche, soya y gelatina).

Oussalah, Caillet, Salmiéri y otros (2004) probaron los efectos antimicrobianos de películas comestibles a base de proteína de leche conteniendo aceite esencial de orégano (1%) y/o pimienta (1%) contra *E. coli* O157:H7 y *Pseudomonas spp.* inoculadas sobre filetes de músculo de res almacenados por 7 días a 4°C. Estos autores encontraron que las películas que contenían el aceite esencial de orégano fueron más efectivas, al lograr reducir alrededor de 1 ciclo log las poblaciones microbianas en comparación con las muestras control y sobre esas películas que contenían aceite esencial de pimienta. Por su parte, Oussalah, Caillet, Salmiéri y otros (2006) determinaron el efecto de la aplicación de películas a base de alginato conteniendo aceites esenciales de orégano, canela o ajedrea (*Satureja spp.*) al 1% sobre poblaciones de *Salmonella Typhimurium* o *E. coli* O157:H7 inoculadas en filetes de carne de res almacenados por 5 días a 4°C. Los autores reportaron que aquellas películas que contenían aceites esenciales de orégano o canela resultaron las más efectivas contra *S. Typhimurium* (reducciones alrededor de 1 ciclo log); mientras que en el caso de *E. coli* O157:H7 la película elaborada con aceite esencial de orégano mostró la mejor reducción (1,97 ciclos log). En el mismo sentido, Millette, Le Tien, Smoragiewics y Lacroix (2007) evaluaron el efecto antimicrobiano de una película a base de alginato, pero usando nisina (500 y 1000 UI) incorporada en la película para controlar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* inoculado sobre filetes de carne de res almacenados por 14 días a 4°C. Los autores encontraron que después de 7 días a 4°C, fue observada una reducción de 0.91 y 1.86 UFC/cm² del microorganismo sobre los filetes de carne de res cubiertos con la película conteniendo 500 o 1000 UI/ml de nisina, respectivamente. Por su parte, estudios realizados por Zinoviadou, Koutsoumanis y Biliaderis (2010) en carne de res fresca picada cubierta con películas a base de aislado de proteína de suero incorporadas con lactato de sodio (NaL) o e-polilisina (e-PL), demostraron que se logró una reducción en la tasa de crecimiento de la flora nativa total y una inhibición total del crecimiento

de las bacterias ácido lácticas cuando se añadió a la película una concentración de 0.75% de e-PL. Mientras que una inhibición significativa del crecimiento de la flora total y de *Pseudomonas* spp., fue logrado con la incorporación de 2% de NaL. Asimismo, Outtara, Giroux, Yefsa y otros (2002) redujeron ligeramente (en 0.5 ciclos log) los recuentos totales de microorganismos presentes naturalmente en carne molida durante los primeros 4 días a 4°C, cuando una película a base de una mezcla de proteínas (caseinato de calcio y aislado de proteína de soya) conteniendo tomillo, salvia y romero en polvo al 3% fue aplicada. Sin embargo, poblaciones de *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus* spp, bacterias ácido lácticas, coliformes, enterobacterias y *Pseudomonas* no se vieron afectadas significativamente por el uso de esta película antimicrobiana.

Por otra parte, Seol, Lim, Jang y otros (2009) lograron reducir las poblaciones de microorganismos totales y *E. coli* por 1.8 y 2.7 UFC/g, respectivamente, en pechuga de pollo cubierta por una película a base de zeína conteniendo EDTA (5 mM) y ovotransferrina (25 mg) como antimicrobianos y almacenada por 7 días a 5°C. De la misma forma, Janes, Kooshesh y Johnson (2002) lograron reducir en 1.69 y 2.03 ciclos logarítmicos las poblaciones de *L. monocytogenes* en pollo listo-para-comer, almacenado 8 días a 4°C, utilizando nisina (1 000 UI/g) y nisina (1 000 UI/g)-propionato de calcio (1%), respectivamente, incorporadas en una película a base de zeína usada para cubrir el producto. Sin embargo, el efecto antimicrobiano de la nisina sola incorporada en la película comestible se vio intensificado (hasta 2.59 reducciones logarítmicas) cuando un aumento en la temperatura (8°C) de almacenamiento fue llevado a cabo.

En otros estudios, Hong, Lim y Song (2009) obtuvieron un efecto antimicrobiano en lomo de cerdo cuando se aplicó una película a base de una mezcla de gelatina y agarosa de alga roja conteniendo extracto de semilla de toronja (0.08%) o extracto de té verde (2.8%). Estos autores lograron inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 y reducir las poblaciones de *L. monocytogenes* por alrededor de 1 ciclo log después de 7 días a 4 °C. Por su parte, Kang, Jo, Kwon y otros (2007) evaluaron el efecto de un recubrimiento comestible a base de pectina conteniendo polvo de té verde (0.5%) sobre la calidad de hamburguesas de cerdo envasadas en aire o al vacío y almacenadas por 14 días a 10°C. Los autores reportaron que la población inicial de microorganismos aeróbicos totales (10^4 UFC/mg) se redujo hasta niveles indetectables por más de 7 días bajo condiciones de vacío; mientras que bajo condiciones normales de atmósfera (aire) se tuvo un nivel de 10^5 UFC/mg, las cuales estuvieron en 10^8 UFC/mg, después de 7 días a 10 grados Celsius.

Por otra parte, Dawson, Carl, Anton y Han (2007) evaluaron la efectividad antimicrobiana de películas a base de proteína de soya conteniendo ácido láurico (8%) y nisina (400 UI/g) solas o combinadas contra *L. monocytogenes* inoculada en mortadela de pavo, logrando reducir 1 ciclo log de *L. monocytogenes* después de 21 días a 4°C. Sin em-

bargo, un mayor efecto antimicrobiano fue observado por Santiago-Silva, Soares, Nóbrega y otros (2009), quienes demostraron que la incorporación de pediocinas (25% o 50%) en una emulsión para películas a base de celulosa logró reducir las poblaciones de microorganismos patogénicos como *Listeria* y *Salmonella* en rebanadas de jamón inoculadas. Estas películas antimicrobianas demostraron ser más efectivas contra *Listeria*, ya que con 50% de pediocinas se redujeron 2 ciclos log en comparación con el control, y sólo 0.5 ciclos log de *Salmonella*. De igual forma, Gadang, Hettiarachchy, Johnson y Owens (2008) consiguieron reducir las poblaciones inoculadas de *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en 2 ciclos log y *S. Typhimurium* en 1 ciclo log en salchichas tipo “Frankfurt” almacenadas a 4°C durante 28 días, usando películas comestibles a base de proteína de suero de leche incorporadas con una combinación de nisina (6 000 UI/g), ácido málico (1%) y extracto de semilla de uvas (0.5%), además de EDTA (1.6 mg/ml) para los casos de *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7. Resultados similares fueron reportados por Theivendran, Hettiarachchy y Johnson (2006), quienes evaluaron el efecto bactericida de la nisina (10 000 UI/g) combinado con extracto de semillas de uva (1%) o extracto de té verde (1%) contra *L. monocytogenes* inoculada sobre salchichas tipo “Frankfurt” de pavo sumergidas en soluciones formadoras de películas a base de proteína de soya. Estos autores lograron disminuir la población de *L. monocytogenes* por más de 2 ciclos log después de 28 días de almacenamiento a 4 o 10°C. De la misma manera, Franklin, Cooksey y Getty (2004) lograron reducir por más de 2 ciclos log las poblaciones de *L. monocytogenes* en salchichas tipo “perro caliente” almacenadas por 28 días a 4°C, pero usando nisina sola (2 500 UI/ml) y en una menor concentración dentro de una película hecha a base de metilcelulosa/hidroxipropilmetilcelulosa. No obstante, Marcos, Aymerich, Monfort y Garriga (2008) encontraron un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* inoculada en jamón cocido durante los primeros 8 días a 1°C, al incorporar enterocinas A y B en películas a base de alginato.

Aplicadas a productos pesqueros

Las películas aplicadas a productos pesqueros han sido elaboradas principalmente a base de gelatina sola o en combinación con quitosano. La gelatina ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de formar películas y por su aplicabilidad como una cobertura externa para proteger los alimentos de la deshidratación, luz y oxígeno. Además este es uno de los primeros materiales propuesto como transportador de compuestos bioactivos (Gómez-Guillen, Pérez-Mateos, Gómez-Estaca y otros, 2009). Las fuentes más abundantes de gelatina son la piel y los huesos de cerdo y ganado. No obstante, en los últimos años la gelatina extraída de pescado ha ganado mucha más importancia.

López-Caballero, Gómez-Guillen, Pérez-Mateos y Montero (2005) evaluaron el efecto conservante de un recubrimiento hecho a base de una mezcla de quitosano y gelatina de piel de pescado (*Lepidorhombus boscii*) sobre hamburguesas de bacalao. Estos investigadores reportaron que los recubrimientos previnieron el deterioro microbiano de las hamburguesas de bacalao durante 8-11 días de almacenamiento refrigerado, indicando que los recuentos de microorganismos fueron más bajos (alrededor de 2 ciclos log) que las muestras control, siendo más efectivos contra las bacterias Gram (-) como enterobacterias y *Pseudomonas* spp. Asimismo, Gómez-Estaca, Montero, Giménez y Gómez-Guillén (2007) demostraron que películas comestibles a base de gelatina-quitosano con extractos de orégano y romero incorporados, lograron reducir los recuentos totales de aerobios y bacterias reductoras de sulfuro de 2 a 3 ciclos log sobre sardinas ahumadas en frío, después de 16 días a 5 grados Celsius.

Por otra parte Datta, Janes, Hue y otros (2008) reportaron que la aplicación de coberturas a base de alginato de calcio con lisozima de ostras o lisozima de huevo de gallina incorporada en el recubrimiento sobre salmón ahumado, resultó efectiva para reducir los niveles de *Salmonella* var. Anatum (alrededor de 2.2 ciclos log) y *L. monocytogenes* (alrededor de 2.7 ciclos log) inoculadas.

Aplicadas a quesos

Los quesos frescos pueden sufrir deterioro por acción de bacterias psicrótrofas Gram (-) (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*), coliformes, levaduras y mohos que llegan a ellos como una contaminación posproceso. Mientras que los quesos madurados están propensos a un deterioro por crecimiento superficial de mohos y levaduras, particularmente si están expuestos al oxígeno. Además, el uso de un cultivo iniciador de crecimiento lento puede permitir el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, y *E. coli* enteropatogénica, los cuales provienen de la leche cruda o de la contaminación posproceso.

Una alternativa novedosa para evitar el deterioro o extender la vida útil de los quesos y garantizar la inocuidad de este tipo de productos es el uso de películas antimicrobianas. Así pues, Cao-Hoang, Grégoire, Chaine y Waché (2010) demostraron que la aplicación de películas a base de caseinato de sodio con la incorporación de sorbitol como plastificante y nisina (1 000 IU/cm²) como antimicrobiano, redujo la población de *Listeria innocua* inoculada en la superficie de quesos madurados, tipo *Mini Babybel*, en 1.1 ciclos log después de un periodo de almacenamiento de 7 días a 4 grados Celsius.

Aplicados a frutas y vegetales

Las coberturas comestibles con agentes antimicrobianos han ganado importancia como una nueva tecnología para reducir los efectos deletéreos causados durante el almacenamiento de frutas enteras y el procesamiento de las frutas y vegetales frescos cortados. Este efecto es más severo en estos últimos, donde el corte induce daños en la estructura celular de los tejidos y favorece la salida de los constituyentes, ocasionando cambios de color, textura y una vida útil microbiológica más corta, ya que funciona como un transporte de diferentes agentes conservantes como antioxidantes, conservadores de textura y antimicrobianos, y nutricionales como vitaminas y minerales.

Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, Del Río y Palou (2009) estudiaron el efecto antifúngico de recubrimientos a base de hidroxipropilmetilcelulosa en combinación con sorbato de potasio (2%), benzoato de sodio (2.5%), propionato de sodio (0.5%), y sus mezclas sobre la conservación poscosecha de naranjas var. "Valencia" enteras. Los autores señalaron que los recubrimientos aplicados lograron reducir significativamente los efectos causados por cepas de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* inoculados en la superficie de las naranjas almacenadas a 20°C, después de un periodo de almacenamiento de 60 días a 5°C, resultando más efectivos los recubrimientos comestibles con sorbato de potasio combinado con propionato de sodio. De manera similar, Park, Stan, Daeschel y Zhao (2005) evaluaron el efecto antifúngico de recubrimientos elaborados a base de quitosano (2%) o hidroxipropil-metilcelulosa (1%) incorporados con sorbato de potasio (0.3%) aplicados sobre fresas frescas inoculadas con cepas de *Cladosporium sp.* o *Rhizopus sp.* y almacenadas por 23 días a 5°C. Los autores reportaron que la incorporación de sorbato de potasio no ejerció un efecto aditivo significativo con respecto a los recubrimientos de quitosano solo, contra los mohos inoculados en fresas frescas. Además, ellos indicaron que la aplicación de los recubrimientos estudiados sobre las fresas disminuyeron los recuentos totales de aerobios y coliformes.

Por su lado, Caillet, Millete, Salmiéri y Lacroix (2006) cubrieron zanahorias inoculadas con *L. innocua* (10^3 UFC/g) con un recubrimiento antimicrobiano basado en una combinación de caseinato de calcio, aislado de proteína de suero de leche, carboximetilcelulosa y pectina conteniendo *trans*-cinamaldehído (0.025%), y encontraron ligeras reducciones (0.5 ciclos log) del microorganismo inoculado después de 21 días a 4 grados Celsius.

Por otra parte, Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros (2007) evaluaron el efecto antimicrobiano de aceites esenciales de hierba de limón (1 y 1.5%) y orégano (0.1 y 0.5%), y de vanillina (0.3 y 0.6%) incorporados en soluciones formadoras de coberturas elaboradas a base de alginato y puré de manzana sobre la flora nativa (aerobios psicrófilos, mohos y levaduras) y *L. innocua* inoculada en manzanas frescas cortadas, encontrando que todos los antimicrobianos utilizados inhibieron significativamente la

flora nativa durante los 21 días de almacenamiento a 4°C, y que los aceites esenciales de hierba de limón y orégano ejercieron un efecto antimicrobiano mayor que la vanillina sobre *L. innocua*, alcanzándose una reducción de hasta de 4 ciclos log. Asimismo, Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008) demostraron que la aplicación de recubrimientos comestibles a base de alginato incorporados con ácido málico solo o en combinación con aceites esenciales de canela de hoja, palmarosa y hierba de limón al 0.3 y 0.7% o sus compuestos activos como: eugenol, geraniol y citral al 0.5%. Lograron reducir significativamente la población de *Salmonella* var. Enteritidis inoculada en trozos de melón frescos por alrededor de 3 a 5 ciclos log, e inhibir el crecimiento de la flora nativa por más de 21 días a 5°C. Así mismo, Raybaudi-Massilia, Rojas-Graü, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008) obtuvieron un resultado similar cuando incorporaron ácido málico solo o en combinación con aceites esenciales de canela de corteza, clavo y hierba de limón al 0.3 y 0.7% o sus compuestos activos cinamaldehído, eugenol o citral al 0.5% en recubrimientos elaborados a base de alginato, lográndose una reducción de la población de *E. coli* O157:H7 inoculada por más de 4 ciclos log después de 30 días de almacenamiento refrigerado sobre trozos de manzana fresca. Se alcanzó una inhibición del crecimiento de la flora nativa por más de 30 días de almacenamiento a 5 grados Celsius.

Por otro lado, Chien, Shev Yang (2007) evaluaron el efecto de la aplicación de recubrimientos comestibles a base de quitosano (0.5, 1 y 2%) en mango fresco cortado almacenado por 7 días a 6°C, encontrándose que el crecimiento de la flora nativa expresado como recuento total de microorganismos fue inhibido en las muestras con recubrimientos elaborados con diferentes concentraciones de quitosano (5.53; 5.41; 5.30 UFC/g) en comparación con el control (6.41 UFC/g). Sin embargo, una mayor efectividad de la aplicación de recubrimiento a base de quitosano fue observada por González-Aguilar, Valenzuela-Soto, Lizardi-Mendoza y otros (2009), quienes encontraron que el uso de coberturas de quitosano de bajo peso molecular (al 2%) y mediano peso molecular (al 1% y 2%) en papayas frescas cortadas causó una reducción del recuento de aerobios mesófilos de 2.8 UFC/g hasta niveles indetectables después de 14 días de almacenamiento a 5°C. Estos autores reportaron, además, que el crecimiento de mohos y levaduras fue también inhibido en las papayas recubiertas en comparación con las papayas control. Esas diferencias en cuanto a la efectividad de la aplicación de las coberturas a base de quitosano pueden ser debidas principalmente al tipo de fruta y carga microbiana inicial.

De otra manera, Sangsuwan, Rattanapanone y Rachtanapun (2008) evaluaron la efectividad de la aplicación de recubrimientos de quitosano/metilcelulosa con y sin la incorporación de vanillina en melón y piña frescas cortados almacenados a 10°C por 8 días. Estos autores encontraron que los niveles de *E. coli* inoculados (5.18 UFC/pieza) disminuyeron significativamente a lo largo del almacenamiento hasta niveles indetectables en melones frescos cortados recubiertos, en comparación con los controles (no recubiertos).

Mientras que los niveles de *Saccharomices cerevisiae* disminuyeron ligeramente en melón fresco cortado y significativamente en piña fresca cortada, recubierta con respecto a los controles. Además, estos autores indicaron que la incorporación de vanillina a la cobertura de quitosano/metilcelulosa aumentó su efectividad contra ambos microorganismos inoculados.

| Impacto sobre los atributos sensoriales

Las películas y recubrimientos comestibles son consumidos normalmente con el producto cubierto, por tanto, la incorporación de compuestos tales como antimicrobianos, antioxidantes y nutraceuticos no debería afectar la aceptación de los consumidores (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). No obstante, algunos autores han indicado que la incorporación de agentes antimicrobianos en recubrimientos comestibles podría influenciar los atributos sensoriales en los alimentos, especialmente cuando se utilizan aceites esenciales de plantas (Burt, 2004). Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros (2007) vieron afectados los atributos sensoriales de manzanas frescas cortadas cubiertas cuando se aplicó un recubrimiento a base de alginato-puré de manzana conteniendo 0.1% (v/v) de aceite esencial de orégano. De igual manera, Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008), y Raybaudi-Massilia, Rojas-Graü, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008) encontraron que manzana y melón frescos cortados recubiertos con una cobertura a base de alginato conteniendo aceites esenciales de canela, hierba de limón, palmarosa y clavo al 0.7% afectaron los atributos sensoriales como textura, color y sabor, por lo que se recomienda que se usen en muy bajas concentraciones y de ser posible en combinación con otras alternativas de conservación, con el propósito de reducir el impacto sobre estos atributos sensoriales. Sin embargo, Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar y Martín-Belloso (2008) reportaron que la incorporación de 0.3% (v/v) de aceite esencial de palmarosa en recubrimientos de alginato sobre melón fresco cortado parece prometedor, ya que fue bien aceptado por los panelistas, a pesar de ser perceptible por los mismos.

En otros estudios realizados sobre recubrimientos antimicrobianos a los cuales le incorporaron ácidos orgánicos, Eswaranandam, Hettiarachchy y Meullenet (2006) encontraron que la adición de ácido málico o láctico al 2.6% (p/v) en recubrimientos a base de proteína de soya, no afectó las propiedades sensoriales de cubos de melón Cantaloupe frescos cortados.

Rojas-Graü, Raybaudi-Massilia, Soliva-Fortuny y otros (2007) evaluaron la calidad sensorial de las manzanas frescas cortadas cubiertas con un recubrimiento de alginato-puré de manzana conteniendo vanillina al 0.3% (p/p), y los panelistas indicaron aceptación

en términos de sabor del producto recubierto. En contraste con estos resultados, Walton, Mayer y Narbad (2003) señalaron que una limitante del uso de la vanillina, a pesar de ser una sustancia GRAS, es el fuerte sabor impartido por este compuesto a las concentraciones mínimas inhibitorias (>0.2%) requeridas en algunos alimentos. Esta diferencia encontrada en los hallazgos de los investigadores está influenciada probablemente por el tipo de alimento al cual se le está añadiendo la sustancia.

El efecto de otros compuestos con propiedades antimicrobianas utilizados como base para la formulación de recubrimientos antimicrobianos como el quitosano, sobre los atributos sensoriales también ha sido evaluado, encontrándose que la calidad sensorial de la fresa fresca cubierta con quitosano al 0.6%, no se vio afectada significativamente durante los 7 días de almacenamientos a 2 °C (Han et al., 2005). Asimismo, Chien, Sheu y Yang (2007) reportaron que el mango fresco cortado recubierto con quitosano al 0.5%, 1% y 2% no varió significativamente sus atributos sensoriales después de tres días de almacenamiento a 6 °C, pero sí fue significativamente alterada después de 7 días en aquellas que contenían quitosano al 1 y 2 por ciento.

| Estatus regulatorio

Las películas y recubrimientos comestibles pueden ser clasificados de acuerdo con las regulaciones europeas y americanas (ED, 1995 y 1998; FDA, 2006) como productos de alimentos, ingredientes de alimentos, sustancias en contacto con los alimentos, o material de empaquetamiento de alimentos. Sin embargo, las películas y recubrimientos son una parte integral de la porción comestible de los alimentos, por tanto, todas las regulaciones requeridas para ingredientes de alimentos deberían ser obligatorias (Guilbert y Gontard, 1995). Los principales organismos gubernamentales dedicados a todo lo concerniente sobre aditivos de alimentos son la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (USFDA, por sus siglas en inglés), el Comité Europeo para la Estandarización (CEN) y el *Codex Alimentarius*, los cuales constituyen en conjunto la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés)/Organización Mundial de la Salud (OMS) (Raju y Bawa, 2006).

La USFDA afirmó que cualquier compuesto a ser incluido en la formulación debería ser generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) o regulado como aditivo alimentario y usado dentro de los límites especificados (USFDA, 2006, 2009 y 2010). En Europa, los ingredientes que pueden ser incorporados dentro de formulaciones de soluciones formadoras de películas son reconocidos principalmente como aditivos alimentarios y están nombrados dentro de la lista de aditivos para fines generales, aunque pectinas, cera de abejas, polisorbato, ácidos grasos, lecitina, y gomas arábicas y karayas,

se mencionan aparte para las aplicaciones de recubrimiento (ED, 1995). En cualquier caso, se permite el uso de estas sustancias formadoras de películas, siempre y cuando se respete el principio de *quantum satis*. Recientemente, el CEN fue complementado por la introducción de criterios específicos de pureza para los aditivos alimentarios (ED, 2008).

Debido a que las películas y recubrimientos comestibles podrían tener ingredientes con un efecto funcional, la inclusión de estos compuestos debería ser mencionada en el etiquetado. En Europa, el uso de aditivos alimentarios siempre debe estar etiquetado en el embalaje según su categoría como antioxidante, conservante, colorante, entre otros. En el reglamento correspondiente de la mayoría de los países, las sustancias químicas añadidas como antimicrobianos son consideradas como aditivos alimentarios, si el propósito principal de las sustancias es la extensión de la vida útil (tabla 2). Sin embargo, cada país tiene sus propios reglamentos de definición de una lista de los aditivos aprobados (ED, 1995, 1998 y 2008; USFDA, 2006 y 2009).

Otro tema importante dentro del estatus regulatorio es la presencia de alérgenos. Muchas películas y recubrimientos comestibles son hechos con ingredientes que podrían causar reacciones alérgicas. Dentro de estos alérgenos tenemos que los derivados de la leche, los frijoles de soya, alimentos marinos (pescado, moluscos, crustáceos, entre otros), el maní, las nueces y el trigo son los más importantes. Varias películas y recubrimientos comestibles están formados por proteínas de la leche (suero, caseína), proteína de trigo (gluten), proteína de soya y proteína de maní. Por tanto, la presencia de un alérgeno conocido incorporado en una película y/o recubrimiento comestible aplicado sobre un alimento debería ser también muy claramente etiquetada (Franssen y Krochta, 2003).

Las proteínas de huevo de gallina tales como: ovotransferrina (Gal d 3), y lisozima (Gal d 4) usadas como antimicrobianos en películas comestibles, las cuales residen en la fracción de la clara del huevo, han sido tradicionalmente implicadas en el desarrollo de alergias por alimentos. Aunque reacciones clínicas a la ovotransferrina y lisozima han sido raramente reportadas, una reacción hipersensitiva mediada por la inmunoglobulina-E (IgE) podría ocurrir en personas alérgicas a estas enzimas (Pérez-Calderón, Gonzalo-Garijo, Lamilla-Yerga y otros, 2007). Por tanto, una condición para el uso seguro de la lisozima y la ovotransferrina sería alertar a la población sensible a estas enzimas en el etiquetado del producto (USFDA, 2010).

| Conclusiones y perspectivas

Queda demostrado que el uso de recubrimientos y películas con propiedades antimicrobianas, constituye una alternativa novedosa de empaque que puede garantizar la inocuidad de diferentes tipos de alimentos, incluyendo productos cárnicos, pesqueros, frutas,

TABLA 2.-ESTATUS REGULATIVO DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS EN PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Agente antimicrobiano	Estatus regulatorio	Cantidad permitida	Referencia
Quitosano	GRAS; GRN 73; GRN 170	BPM	USFDA, 2010
Aceites esenciales de plantas y sus compuestos activos (carvacrol, canela, cinamaldehído, citral, ácido cinámico, cítricos, clavo, eugenol, ajo, geraniol, limón, lima, hierba de limón, mandarina, orégano, palmarosa)	GRAS; 21 CFR 182.10; 21 CFR 182.20; 21 CFR 182.1317; 21 CFR 182.60; 21 CFR 184.1257	BPM	USFDA, 2010
Extracto de semilla de uva	CAS-RN 085594-37-2; 21 CFR 182.20	BPM	USFDA, 2009
Extracto de semilla de toronja	CAS-RN 090045-43-5	BPM	USFDA, 2009
Extracto de té verde	GRN 259	BPM; hasta 540 mg/por porción en jugo.	USFDA, 2006
Lisozima	GRAS, GRN 64; E-1105	BPM; ≤ 5,5mg/kg en tripas de salchicha Frankfurt; ≤ 4,4mg/kg en productos de pollo y carne cocida.	Losso et al., 2000; USFDA, 2006 USFDA, 2010
Nisina	GRAS; GRN 65; 21 CFR 184.1538; E-234; A565; Codex Standard A-8	BPM; ≤ 6,9mg/kg en tripas de salchicha Frankfurt; 5,5-12,5mg/kg en productos de pollo y carne	USFDA, 2010; FSANZ, 2007.

Vanillina	GRAS; 21 CFR 182.60	BPM	USFDA, 2010
Ácidos orgánicos (acético, láctico, málico, propiónico, sórbico, benzoico, y sus sales)	GRAS; 21 CFR 184.1005; 21 CFR 184.1021; 21 CFR 184.1221; 21 CFR 184.1069; 21 CFR 182.3640	BPM	Doores, 1993

GRAS: generalmente reconocido como seguro; GRN: noticia GRAS de acuerdo a la usFDA; A: aplicación de acuerdo a la FSANZ; 21 CFR: Título 21 del Código de las Regulaciones Federales de los Estados Unidos; E: número de código de los aditivos de alimentos de la Unión Europea; CAS-RN: número de registro del servicio de resumen químico. BPM: de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura. Fuente: adaptado de Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, Soliva-Fortuny Y Martín-Belloso (2009)

vegetales y derivados lácteos como quesos, además de extender su vida útil. No obstante, para lograr que su aplicación sea exitosa, se recomienda tomar en cuenta la composición del alimento, para seleccionar el (los) componente(s) básico(s) para la formulación del recubrimiento o película, y el antimicrobiano a utilizar, el tipo y número de microorganismos a controlar y los factores intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento que puedan influir sobre las características del producto. Además, se recomienda incorporar los agentes antimicrobianos en cantidades moderadas para prevenir un impacto negativo sobre las características sensoriales del producto, las cuales son el principal aspecto comúnmente considerado por el consumidor.

Es de esperar que materiales que actualmente son subutilizados o desechados por la industria, como por ejemplo restos de vegetales, plantas, conchas de crustáceos, entre otros, sean aprovechados para la obtención de materiales base (como la celulosa y sus derivados y el quitosano), para la formulación de películas y recubrimientos, logrando así materiales biodegradables y una mejor conservación del medio ambiente.

Asimismo, en los últimos años han surgido una serie de estudios de investigación sobre compuestos de origen natural, como extractos de diferentes plantas, que muestran propiedades antimicrobianas *In vitro* contra microorganismos patogénicos de importancia en alimentos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, entre otras especies. Sin embargo, su aplicación en alimentos en forma directa o a través de recubrimientos y películas no ha sido totalmente estudiada. Por tal motivo, se espera que en los próximos años surjan nuevas propuestas en la formulación de materiales de empaque que incluyan dichos agentes antimicrobianos.

| Referencias

- Abee, T., F. M. Rombouts, J. Hugenholtz, G. Guihard y L. Letellier (1994), "Mode Of Action Of Nisin Z Against *Listeria Monocytogenes* Scott A Grown at High and Low Temperatures", *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1962-1968.
- Almanjo, M. P., R. Carbó, J. A. López-Jiménez y M. H. Gordon (2008), "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tea Infusions", *Food Chemistry*, 108: 55-63.
- Ayala-Zavala, J. F., M. A. Villegas-Ochoa, F. Cuamea-Navarro y G. A. González-Aguilar (2005), "Compuestos volátiles de origen natural. Nueva alternativa para la conservación", en G. A. González-Aguilar, A. A. Gardea y F. Cuamea-Navarro (ed.), *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*, Sonora, México, CIAD, pp. 314-338.
- Begin, A. y M. R. van Calsteren (1999), "Antimicrobials Films Produced from Chitosan", *International Journal of Biological Macromolecules*, 26: 63-67.
- Beuchat, L. R. (1996), "Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce", *Journal of Food Protection*, 59: 204-216.

- Bhunia, A. K., M. C. Johnson, B. Ray y N. Kalchayanand (2008), "Mode of Action of Pediocin ACh from *Pediococcus Acidilactici* H on Sensitive Bacterial Strains", *Journal of Applied Microbiology*, 70(1): 25-33.
- Burt, S. (2004), "Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods: A Review", *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Cagri, A., Z. Ustunol y E. Ryser (2004), "Antimicrobial Edible Films and Coating", *Journal of Food Protection*, 67: 833-848.
- Cagri, A., Z. Ustunol y E. Ryser (2001), "Antimicrobial, Mechanical, and Moisture Barrier Properties of Low Ph Whey Protein-Based Edible Films Containing P-Aminobenzoic or Sorbic Acids", *Journal of Food Science*, 66 (6): 865-870.
- Caillet, S., M. Millete, S. Salmiéri y M. Lacroix (2006), "Combined Effects of Antimicrobial Coating, Modified Atmosphere Packaging, and Gamma Irradiation on *Listeria innocua* Present in Ready-to-Use Carrots (*Daucus carota*)", *Journal of Food Protection*, 69 (1): 80-85.
- Cao-Hoang, L., L. Grégoire, A. Chaine y I. Waché (2010), "Importance and Efficiency of In-depth Antimicrobial Activity for the Control of *Listeria* Development with Nisin-incorporated Sodium Caseinate Films", *Food Control*, 21(9): 1227-1233.
- Cha, D. S., J. H. Choi, M. S. Chinnan y H. J. Park (2002), "Antimicrobial Films Based on Na-alginate an k-carrageenan", *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35: 715-719.
- Chien, P. J., F. Sheu y F. H. Yang (2007), "Effects of Edible Chitosan Coating on Quality and Shelf Life of Sliced Mango Fruit", *Journal of Food Engineering*, 78: 225-229.
- Crandall, A. D. y T. J. Montville (1998), "Nisin Resistance in *Listeria Monocytogenes* ATCC 700302 is a Complex Phenotype", *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 231-237.
- Cutter, C. N. (2006), "Opportunities for Bio-Based Packaging Technologies to Improve The Quality and Safety of Fresh and Further Processed Muscle Foods", *Meat Science*, 74: 131-142.
- Datta, S., M. E. Janes, Q. G. Xue, J. Losso y J. F. La Peyre (2008), "Control of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Anatum* on the Surface of Smoked Salmon Coated with Calcium Alginate Coating Containing Oyster Lysozyme and Nisin", *Journal of Food Science*, 73 (2): M67-M71.
- Davidson, P. M. y T. M. Taylor (2007), "Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds", en M. P. Doyle y L. R. Beuchat (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3a. ed., Washington, D. C., ASM Press, pp. 713-746.
- Davidson, P. M. y S. Zivanovic (2003), "The Use of Natural Antimicrobials", en P. Zeuthen y L. Bøgh-Sørensen (ed.), *Food Preservation Techniques*, Boca Ratón, Florida, CRC Press LLC, pp. 5-30.
- Dawson, P. L., G. D. Carl, J. C. Acton e I. Y. Han (2007), "Efecto de películas a base de soya impregnadas con ácido láurico y nisina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en mortadela de pavo", *Mundo lácteo y cárnico*, mayo/junio, 13-21.
- Devlieghere, F., A. Vermeulen y J. Debevere (2004), "Chitosan: Antimicrobial Activity, Interactions with Food Components and Applicability as a Coating on Fruit and Vegetables", *Food Microbiology*, 21: 703-714.
- Díaz-Cinco, M. E., E. Acedo-Félix y A. García-Galaz (2005), "Principales microorganismos patógenos y de deterioro", en G. A. González-Aguilar, A. A. Gardea y F. Cuamea-Navarro (ed.), *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*, Sonora, México, CIAD, pp. 216-240.

- Dong, H., L. Cheng, J. Tan, K. Zheng y Y. Jiang (2004), "Effects of Chitosan Coating on Quality and Shelf Life of Peeled Litchi Fruit", *Journal of Food Engineering*, 64: 355-358.
- Doores, S. (1993), "Organic Acids", en P. M. Davidson y A. L. Branen (eds), "Antimicrobials in Food", Nueva York, Marcel Dekker, pp. 95-136.
- Dutta, P. K., S. Tripathi, G. K. Mehrotra y J. Dutta (2009), "Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Applications", *Food Chemistry*, 114 (4): 1173-1182.
- European Parliament and Council Directive N° 95/2/EC. (ED) (1995), *On Food Additive Other than Colors and Sweeteners*, disponible en: <http://ec.europa.eu/Food/fs/sfp/addit_Flavor/flav11_en.pdf>, consultado el 25 de septiembre de 2009.
- European Parliament and Council Directive N_ 98/72/EC (ED) (1998), *On Food Additive Other than Colors and Sweeteners*, disponible en: <http://ec.europa.eu/Food/fs/sfp/addit_Flavor/flav11_en.pdf>, consultado el 25 de septiembre de 2009.
- European Parliament and Council Directive N_ 2008/84/EC (ED) (2008), *Laying Down Specific Purity Criteria on Food Additives other than Colours and Sweeteners*, disponible en: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/Lex-UriServ.do?uri=OJ:L:2008:253:0001:0175:EN:PDF>>, consultado el 25 de septiembre de 2009.
- Eswaranandam, S., N. S. Hettiarachchy y J. F. Meullenet (2006), "Effect of Malic and Lactic Acid Incorporated Soy Protein Coatings on the Sensory Attributes of Whole Apple and Fresh-Cut Cantaloupe", *Journal of Food Science*, 71: S307-S313.
- Fitzgerald, D. J., M. Stratford, M. J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos y A. Narbad (2004), "Mode of Antimicrobial Action of Vanillin Against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*", *Journal of Applied Microbiology*, 97: 104-113.
- Food Standards Australian New Zealand (FSANZ) (2007), "Application A565. Use of Nisin in Processed Meat Products", disponible en: <<http://www.foodstandards.gov.au>>, consultado el 6 de septiembre de 2009.
- Franklin, N. B., K. D. Cooksey y K. J. K. Getty (2004), "Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the Surface of Individually Packaged Hot Dogs with a Packaging Film Coating Containing Nisin", *Journal of Food Protection*, 67 (3): 480-485.
- Franssen, L. R. y J. M. Krochta (2003), "Edible Coatings Containing Natural Antimicrobials for Processed Foods", en S. Roller (ed.), "Natural Antimicrobials for Minimal Processing of Foods", Boca Ratón, Florida, CRC Press, pp. 250-262.
- Frei, B. y J. V. Higdon (2003), "Antioxidant Activity of Tea Polyphenols *In Vivo*: Evidence from Animal Studies", *Journal of Nutrition*, 133 (10): 3275S-3284S.
- Gadang, V. P., N. S. Hettiarachchy, M. G. Johnson y C. Owens (2008), "Evaluation of Antibacterial Activity of Whey Protein Isolate Coating Incorporated with Nisin, Grape Seed Extract, Malic Acid, and EDTA on a Turkey Frankfurter System", *Journal of Food Science*, 73 (8): M389-M394.
- Gennadios, A., M. A. Hanna y L. B. Kurth (1997), "Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review", *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 30: 337-350.
- Gómez-Estaca, J., P. Montero, B. Giménez, M. C. Gómez-Guillén (2007), "Effect of Functional Edible Films and High Pressure Processing on Microbial and Oxidative Spoilage in Cold-Smoked Sardine (*Sardina pilchardus*)", *Food Chemistry*, 105 (2): 511-520.

- Gómez-Guillén, M. C., M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez y P. Montero (2009), "Fish Gelatin: A Renewable Material for Developing Active Biodegradable Films", *Trends in Food Science and Technology*, 20: 3-16.
- González-Aguilar, G. A., I. N. Monroy-García, F. Goycoolea-Valencia, M. E. Díaz-Cinco y J. F. Ayala-Zavala (2005), "Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papayas frescas cortadas", en G. González-Aguilar y F. Cuamea-Navarro (eds.), *Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas*, Hermosillo, Mexico, CIAD, pp. 121-133.
- González-Aguilar, G. A., E. Valenzuela-Soto, J. Lizardi-Mendoza, F. Goycoolea, M. A. Martínez-Tellez, M. A. Villegas-Ochoa, I. N. Monroy-García y J. F. Ayala-Zavala (2009), "Effect of Chitosan Coating in Preventing Deterioration and Preserving the Quality of Fresh-Cut Papaya 'Maradol'", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 15-23.
- Gould, G. W. (1989), "Introduction", en G. W. Gould (ed.), "Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures", Londres, Elsevier Applied Science, pp. 1-42.
- Guilbert, S. y N. Gontard (1995), "Edible and Biodegradable Food Packaging", en P. Ackermann, M. Jägerstad y T. Ohlsson (ed.), *Foods and Packaging Materials—Chemical Interactions*, Inglaterra, The Royal Society of Chemistry, pp. 159-168.
- Han, C., C. Lederer, M. McDaniel y Y. Zhao (2005), "Sensory Evaluation of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*) Coated with Chitosan-Based Edible Coatings", *Journal of Food Science*, 70: S172-S178.
- Heggers, J. P., J. Cottingham, J. Gusman, L. Reagor, L. McCoy, E. Carino, R. Cox y J. G. Zhao (2002), "The Effectiveness of Processed Grapefruit-Seed Extract as an Antibacterial Agent: II. Mechanism of Action and *In Vitro* Toxicity", *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8 (3): 333-340.
- Helander, I. M. y T. Mattila-Sandholm (2000), "Permeability Barrier of the Gram-negative Bacterial Outer Membrane with Special Reference to Nisin", *International Journal of Food Microbiology*, 60 (2-3): 153-161.
- Hong, Y. H., G. O. Lim y K. B. Song (2009), "Physical Properties of Gelidium Corneum-Gelatin Blend Films Containing Grapefruit Seed Extract or Green Tea Extract and its Application in the Packaging of Pork Loins", *Journal of Food Science*, 74 (1): C6-C10.
- Ibrahim, H. R., Y. Sugimoto y T. Aoki (2000), "Ovotransferrin Antimicrobial Peptide (OATP-92) Kills Bacteria through a Membrane Damage Mechanism", *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1523(2-3): 196-205.
- Janes, M. E., S. Kooshesh, M. G. Johnson (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 (7): 2754-2757.
- Jayaprakasha, G. K., T. Selvi y K. K. Sakariah (2003), "Antibacterial and Antioxidant Activities of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Extracts", *Food Research International*, 36 (2): 117-122.
- Kang, H. J., C. Jo, J. H. Kwon, J. H. Kim, H. J. Chung y M. W. Byun (2007), "Effect of a Pectin-Based Edible Coating Containing Green Tea Powder on the Quality of Irradiated Pork Patty", *Food Control*, 18 (5): 430-435.

- Ko, K. Y., A. F. Mendoca y D. U. Ahn (2008), "Effect of Ethylenediaminetetraacetic and Lysozyme on the Antimicrobial Activity of Ovotransferrin Against *Listeria monocytogenes*", *Poultry Science*, 87: 1649-1658.
- Krxmer, J. y H. Brandis (1975), "Mode of Action of Two *Streptococcus faecium* Bacteriocins", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7 (2): 117-120.
- Lin, D. y Z. 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.
- Liu, H., Y. Du, X. Wang y L. Sun (2004), "Chitosan Kills Bacteria through Cell Membrane Damage", *International Journal of Food Microbiology*, 95: 147-155.
- López-Caballero, M. E., M. C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos y P. Montero (2005), "A Chitosan-Gelatin Blend as a Coating for Fish Patties", *Food Hydrocolloids*, 19 (2): 303-311.
- Losso, J. N., S. Nakai y E. A. Charter (2000), "Lysozyme", en A. S. Naidu (ed.), "Natural Food Antimicrobial Systems", Boca Ratón, Florida, CRC Press, pp. 185-210.
- Marcos, B., T. Aymerich, J. M. Monfort y M. Garriga (2008), "High-Pressure Processing and Antimicrobial Biodegradable Packaging to Control *Listeria monocytogenes* During Storage of Cooked Ham", *Food Microbiology*, 25: 177-182.
- Marugg, J. D. (1991), "Bacteriocins, their Role in Developing Natural Products", *Food Biotechnology*, 5 (3): 305-312.
- Millette, M., C. Le Tien, W. Smoragiewicz y M. Lacroix (2007), "Inhibition of *Staphylococcus Aureus* on Beef by Nisin-containing Modified Alginate Films and Beads", *Food Control*, 18: 878-884.
- Nikaido, H. (1996), "Outer Membrane", en F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, Washington, D. C., ASM Press, pp. 29-47.
- Nychas, G. J. E., P. N. Skandamis y C. C. Tassou (2003), "Antimicrobials from Herbs and Spices", en S. Roller (ed.), *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods*, Washington, D. C., CRC Press, pp. 177-199.
- Oussalah, M., S. Caillet y M. Lacroix (2006), "Mechanism of Action Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils Against Cell Membrane and Walls of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*", *Journal of Food Protection*, 69: 1046-1055.
- Oussalah, M., S. Caillet, S. Salmiéri, L. Saucier y M. Lacroix (2006), "Antimicrobial Effects of Alginate-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle", *Journal of Food Protection*, 69 (10): 2364-2369.
- Oussalah, M., S. Caillet, S. Salmiéri, L. Saucier y M. Lacroix (2004), "Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle", *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52: 5598-5605.
- Quattara, B., M. Giroux, R. Yefsah, W. Smoragiewicz, L. Saucier, J. Borsa y M. Lacroix (2002), "Microbiological and Biochemical Characteristics of Ground Beef as Affected by Gamma Irradiation, Food Additive and Edible Coating Film", *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 299-304.
- Padgett, T., I. Y. Han y P. L. Dawson (1998), "Incorporation of Food-Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films", *Journal of Food Protection*, 61 (19): 1330-1335.

- Park, S. I., S. D. Stan, M. A. Daeschel y Y. Zhao (2005), "Antifungal Coatings on Fresh Strawberries (*Fragaria × ananassa*) to Control Mold Growth During Cold Storage", *Journal of Food Science*, 70(4): M202-M207.
- Pen, L. T. y Y. M. Jiang (2003), "Effects of Chitosan Coating on Shelf Life and Quality of Fresh-cut Chinese Water Chestnut", *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36: 359-364.
- Pérez-Calderón, R., M. A. Gonzalo-Garijo, A. Lamilla-Yerga, R. Mangas-Santos y I. Moreno-Gastón (2007), "Recurrent Angioedema Due to Lysozyme Allergy", *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17: 264-266.
- Pranoto, Y., S. K. Rakshit y V. M. Salokhe (2005), "Enhancing Antimicrobial Activity of Chitosan Films Incorporating Garlic Oil, Potassium Sorbate and Nisin", *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38: 859-865.
- Pranoto, Y., V. M. Salokhe y S. K. Rakshit (2005), "Physical and Antibacterial Properties of Alginate-Based Edible Film Incorporated with Garlic Oil", *Food Research International*, 38: 267-272.
- Raju, P. S. y A. S. Bawa (2006), "Food Additives in Fruit Processing", en Y. H. Hui (ed.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Ames, Iowa, Blackwell Publishing, pp. 145-170.
- Raybaudi-Massilia, R. M., J. Mosqueda-Melgar y O. Martín-Belloso (2008), "Edible Alginate-Based Coating as Carrier of Antimicrobials to Improve Shelf Life and Safety of Fresh-Cut Melon", *International Journal of Food Microbiology*, 121: 313-327.
- Raybaudi-Massilia, R. M., J. Mosqueda-Melgar, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso (2009), "Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-Cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobial", *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 8: 157-180.
- Raybaudi-Massilia, R. M., M. A. Rojas-Graü, J. Mosqueda-Melgar y O. Martín-Belloso (2008), "Comparative Study on Essential Oils Incorporated into an Alginate-Based Edible Coating to Assure the Safety and Quality of Fresh-Cut Fuji Apples", *Journal of Food Protection*, 71: 1150-1161.
- Rojas-Graü, M. A., R. J. Avena-Bustillo, M. Friedman, P. R. Henika, O. Martín-Belloso y T. H. McHugh (2006), "Mechanical, Barrier, and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9262-9267.
- Rojas-Graü, M. A., R. M. Raybaudi-Massilia, R. C. Soliva-Fortuny, R. J. Avena-Bustillos, T. H. McHugh y O. Martín-Belloso (2007), "Apple Puree-Alginate Edible Coating as Carrier of Antimicrobial Agents to Prolong Shelf Life of Fresh-Cut Apples", *Postharvest Biology and Technology*, 45: 254-64.
- Rojas-Graü, M. A., R. C. Soliva-Fortuny y O. Martín-Belloso (2009), "Edible Coatings to Incorporate Active Ingredients to Fresh-Cut Fruits: A Review", *Trends in Food Science and Technology*, 20: 438-447.
- Rozès, N. y C. Peres (1998), "Effects of Phenolic Compounds on the Growth and the Fatty Acid Composition of *Lactobacillus plantarum*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 108-111.
- Saito, M., H. Hosoyama, T. Ariga, S. Kataoka y N. Yamaji (1998), "Antiulcer Activity of Grape Seed Extract and Procyanidins", *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1460-1464.

- Sangsuwan, J., N. Rattanapanone y P. Rachtanapun (2008), "Effect of Chitosan/Methyl Cellulose Films on Microbial and Quality Characteristics of Fresh-Cut Cantaloupe and Pineapple", *Postharvest Biology and Technology*, 49: 403-410.
- Santiago-Silva, P., N. F. F. Soares, J. E. Nóbrega, M. A. W. Junior, K. B. F. Barbosa, A. C. P. Volp, E. R. M. A. Zerdas y N. J. Würllitzer (2009), "Antimicrobial Efficiency of Film Incorporated with Pediocin (ALTA 2351) on Preservation of Sliced Ham", *Food Control*, 20: 85-89.
- Sebti, I., A. Martial-Gros, A. Carnet-Pantiez, S. Grelier y V. Coma (2005), "Chitosan Polymer as Bioactive Coating and Film Against *Aspergillus niger* Contamination", *Journal of Food Science*, 72: M100-M104.
- Seol, K. H., D. G. Lim, A. Jang, C. Jo y M. Lee (2009), "Antimicrobial Effect of κ -carrageenan-Based Edible Film Containing Ovotransferrin in Fresh Chicken Breast Stored at 5°C", *Meat Science*, 83(3): 479-483.
- Seydim, A. C. y G. Sarikus (2006), "Antimicrobial Activity of Whey Protein Based Edible Films Incorporated with Oregano, Rosemary and Garlic Essential Oils", *Food Research International*, 39: 639-644.
- Shimamura, T., W. H. Zhao y Z. Q. Hu (2007), "Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Antiinfective Agent", *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6: 57-62.
- Sobrino-López, A. y O. Martín-Belloso (2008), "Use of Nisin and Other Bacteriocins for Preservation of Dairy Products", *International Dairy Journal*, 18: 329-343.
- Stratford, M. y T. Eklund (2003), "Organic Acids and Esters", en N. J. Russell y G. W. Gould (ed.), *Food Preservatives*, 2a. ed., Londres, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 48-84.
- Taylor, P. W., J. M. T. Hamilton-Miller y P. D. Stapleton (2005), "Antimicrobial Properties of Green Tea Catechins", *Food Science and Technology Bulletin*, 2: 71-81.
- Theivendran, S., N. S. Hettiarachchy y M. G. Johnson (2006), "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters", *Journal of Food Science*, 71 (2): M39-M44.
- Thomas, L. V., M. R. Clarkson, J. Delves-Broughton (2000), "Nisin", en A. S. Naidu (ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*, Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 463-524.
- U. S. Food and Drug Administration (USFDA) (2006), *Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption 21CFR172, Subpart C. Coatings, Films and Related Substances*.
- U. S. Food and Drug Administration (USFDA) (2006), *GRAS Substances (SCOGS) Database*, disponible en: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASSubstancesSCOGSDatabase/default.htm>>, consultado el 18 de marzo de 2010.
- U. S. Food and Drug Administration (USFDA) (2009), *Everything Added to Food in the United States*, disponible en: <<http://www.fda.gov/Food/foodingredientspackaging/ucm115326.htm>>, consultado el 12 de marzo de 2010.
- U. S. Food and Drug Administration (USFDA) (2010), *Listing of Food Additive Status Part I and Part II*, disponible en: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/FoodAdditiveListings/ucm091048.htm>>, consultado el 17 de marzo de 2010.
- Valencia-Chamorro, S. A., M. B. Pérez-Gago, M. A. del Río y L. Palou (2009), "Effect of Antifungal Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)-Lipid Edible Composite Coatings on Postharvest

- Decay Development and Quality Attributes of Cold-Stored 'Valencia' Oranges", *Postharvest Biology and Technology*, 54 (2): 72-79.
- Vargas, M., A. Chiralt, A. Albors, C. González-Martínez (2009), "Effect of Chitosan-Based Edible Coatings Applied by Vacuum Impregnation on Quality Preservation of Fresh-Cut Carrot", *Postharvest Biology and Technology*, 51: 263-271.
- Walton, N. J., M. J. Mayer y A. Narbad (2003), "Vanillin", *Phytochemistry*, 63: 505-515.
- Ye, M., H. Neetoo y H. Chen (2008), "Effectiveness of Chitosan-Coated Plastic Films Incorporating Antimicrobials in Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon", *International Journal of Food Microbiology*, 127: 235-240.
- Zinoviadou, K. G., K. P. Koutsoumanis y C. G. Biliaderis (2010), "Physical and Thermo-Mechanical Properties of Whey Protein Isolate Films Containing Antimicrobials, and their Effect Against Spoilage Flora of Fresh Beef", *Food Hydrocolloids*, 24 (1): 49-59.

