



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EFECTO ANTIBACTERIANO DE FILMS DE ALMIDÓN CON ÁCIDOS FENÓLICOS: APLICACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIAS E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Rosa Elena González Guevara

TUTOR/A ACADEMICO: M^a Amparo Chiralt Boix

COTUTOR/A: Lorena María Atarés Huerta

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Ramón Ordoñez Lagos

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, 5 DE JULIO DE 2019

EFECTO ANTIBACTERIANO DE FILMS DE ALMIDÓN CON ÁCIDOS FENÓLICOS: APLICACIÓN EN MATRICES ALIMENTARIAS.

Rosa Elena González Guevara, Ramón Ordoñez Lagos¹, Lorena Atarés Huerta¹, M^a Amparo Chiralt Boix¹.

RESUMEN

Actualmente alrededor de la mitad de los desechos plásticos son envases, siendo el sector alimentario de los mayores consumidores y responsables de la problemática medioambiental. El almidón es un material biodegradable con capacidad para formar films, de bajo coste y aptos para el contacto alimentario representando una alternativa a esta problemática. Adicionalmente se ha registrado una tendencia de los consumidores hacia alimentos libres de aditivos sintéticos, dificultando el aseguramiento de la calidad e inocuidad de los mismos. Los ácidos fenólicos son compuestos naturales, algunos con comprobada actividad antimicrobiana y potencial aplicación en alimentos. En este sentido, se planteó la incorporación de los ácidos ferúlico y cinámico por mezclado en fundido a matrices de almidón para la obtención de films activos y su aplicación como material de envase o recubrimiento activo de alimentos. El efecto antimicrobiano de las películas fue analizado en ensayos *in vitro* con medio de cultivo y en diferentes matrices alimentarias (melón y pollo). Las placas se inocularon con cepas bacterianas gram positivas y negativas (*L. innocua* y *E. coli*); que fueron posteriormente cubiertas por películas con diferentes niveles de cada activo (1%, 2% y 3%) incluyendo muestras control sin recubrimiento y film de almidón sin activo. Los resultados mostraron una inhibición del crecimiento bacteriano de las películas con concentración de activo superior al 2%. Se detectó una mayor actividad inhibitoria del ácido cinámico, que pudo estar relacionada con una mayor liberación del film, comparada con los films con ácido ferúlico. Además, se observó un mayor efecto inhibitorio de los activos en las muestras inoculadas con *L. innocua*.

PALABRAS CLAVES: Films activos; almidón; ácido cinámico; ácido ferúlico; actividad antibacteriana; matrices alimentarias.

RESUM

Actualment al voltant de la meitat de les deixalles plàstiques són envases, sent el sector alimentari dels majors consumidors i responsables de la problemàtica mediambiental. El midó és un material biodegradable amb capacitat per a formar films, de baix cost i aptes per al contacte alimentari representant una alternativa a aquesta problemàtica. Adicionalment s'ha

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD)
Universitat Politècnica de València

registrar una tendència dels consumidors cap a aliments lliures d'additius sintètics, dificultant l'assegurament de la qualitat i innocuïtat d'aquests. Els àcids fenòlics són compostos naturals, alguns amb comprovada activitat antimicrobiana i potencial aplicació en aliments. En aquest sentit, es va plantejar la incorporació dels àcids ferúlic i cinàmic per barrejat en fos a matrius de midó per a l'obtenció de films actius i la seua aplicació com a material d'envàs o recobriment actiu d'aliments. L'efecte antimicrobià de les pel·lícules va ser analitzat en assajos *in vitro* amb mitjà de cultiu i en diferents matrius alimentàries (meló i pollastre). Les plaques es van inocular amb ceps bacterians gram positives i negatives (*L. innocua* i *E. coli*); que van ser posteriorment cobertes per pel·lícules amb diferents nivells de cada actiu (1%, 2% i 3%) incloent mostres control sense recobriment i film de midó sense actiu. Els resultats van mostrar una inhibició del creixement bacterià de les pel·lícules amb concentració d'actiu superior al 2%. Es va detectar una major activitat inhibidora de l'àcid cinàmic, que va poder estar relacionada amb un major alliberament del film, comparada amb els films amb àcid ferúlic. A més, es va observar un major efecte inhibitori dels actius en les mostres inoculades amb *L. innocua*.

PARAULES CLAU: Films actius; midó; acidifique cinàmic; àcid ferúlic; activitat antibacteriana; matrius alimentàries.

ABSTRACT

Currently, about half of plastic waste is packaging, and the food sector is the largest plastic consumer, hence it is highly responsible for environmental problems. Starch is a low cost film-forming biodegradable material suitable for food contact, hence it may help solve this problem. Additionally, consumers prefer food free of synthetic additives, and this hinders to ensure the food quality and safety. Phenolic acids are natural compounds with proven antimicrobial activity and potential application in foods. In this sense, the incorporation of ferulic and cinnamic acids (1%, 2% and 3%) into starch films produced by melt mixing was tested, aiming to produce active films. These were applied as packaging material or active food coating. The antimicrobial effect of the films was analyzed both in *in vitro* tests, with culture medium, and in different dietary matrices (melon and chicken). The plates were inoculated with either gram positive or negative bacterial strains (*L. innocua* and *E. coli*); which were later covered by the films, including uncoated control samples. The results showed an inhibition of the bacterial growth of the films with active concentration higher than 2%. A greater inhibitory activity of cinnamic acid was detected, which could be related to a greater release from the film, as compared to films with ferulic acid. In addition, a greater inhibitory effect of the active compounds was observed against *L. innocua*.

KEYWORDS: Active films; starch; cinnamic acid; ferulic acid; antibacterial activity; dietary matrices.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, alrededor de la mitad de los desechos plásticos son provenientes de embalajes de plástico y su mala gestión provoca una pérdida de recursos y valor, además de graves repercusiones ambientales, sociales y económicas por la contaminación que producen. En este sentido, la cuarta asamblea de las Naciones Unidas para el medio ambiente ha logrado un acuerdo global que alienta a los estados miembros a combatir la problemática de los productos de plástico desechables, promoviendo la determinación y el desarrollo de alternativas ambientalmente inocuas a estos productos y teniendo en cuenta las consecuencias de la totalidad del ciclo de vida de esas alternativas. Además, se promueve la colaboración con la industria para alentar al sector privado a innovar y encontrar alternativas a los productos de plástico desechables que sean asequibles e inocuas para el medio ambiente. En este contexto, se anima a los estados miembros a adoptar medidas respecto a las alternativas sostenibles de estos productos, invitando a diferentes sectores a que promuevan y mejoren la cooperación en la investigación científica y el desarrollo de alternativas ambientalmente racionales para dichos productos, con el fin de reducir la contaminación de los plásticos (PNUMA, 2019).

Aunado a la problemática medio ambiental, actualmente nuestra alimentación se ha desplazado hacia el consumo de productos altamente procesados, con la necesidad de abastecer adecuadamente a una población en aumento. Por estos motivos se hace necesaria la elaboración de alimentos con mayor tiempo de vida útil, manteniendo unas características organolépticas, higiénicas y sanitarias adecuadas. Para satisfacer estas exigencias, el papel que representa el uso de aditivos alimentarios en la industria moderna es de gran importancia, de tal modo que sin ellos sería prácticamente imposible obtener una producción óptima, con las garantías de seguridad higiénica y los estándares de calidad que actualmente se requieren para ofrecer productos competitivos en el mercado. Sin embargo, los aditivos alimentarios producen cierto rechazo en los consumidores, lo que ha generado una tendencia creciente en torno a los alimentos sin aditivos y con menor grado de procesamiento. El etiquetado de dichos productos es objeto de constante consulta por parte de los consumidores (Ruiz y Torija, 2013).

La industria alimentaria considera todos estos factores, y se inclina a ofertar productos que sean del agrado y aceptación del consumidor en general, aunque esto implique la utilización casi obligada de los aditivos alimentarios para conseguirlo. La sustitución de aditivos sintéticos por compuestos que sean totalmente naturales es una tendencia actual en la industria, de modo que estos nuevos aditivos se puedan declarar de una forma que no conduzca al rechazo de los mismos por parte de los consumidores al encontrarlos en las etiquetas (Galanakis, 2018).

Atendiendo a la problemática ambiental y la tendencia anteriormente mencionada muchos investigadores se han enfocado en desarrollar materiales de envases bioactivos a partir de materias primas biodegradables y sustentables. Con estos materiales se pueden elaborar películas y recubrimientos que generen menor grado de contaminación y sean capaces

de prolongar la vida útil de alimentos sensibles (Carvalho, 2008; Gu et al., 2013; Armentano et al., 2013; Moreno, 2017; Requena, 2018).

El término “película comestible” se ha relacionado con aplicaciones alimentarias solo en los últimos 50 años. Se utiliza en la mayoría de los casos para indicar que la superficie de un alimento está cubierta por una capa relativamente delgada de material comestible. Estas películas se utilizan para limitar el deterioro de diferentes alimentos (frutas, verduras, etc...), aumentando su vida útil a través de diferentes mecanismos, como su acción antimicrobiana o su capacidad barrera al oxígeno (Embuscado y Huber, 2009). Adicionalmente, los recubrimientos comestibles pueden ser una alternativa al envasado en atmósferas modificadas, mejorando su seguridad mediante la incorporación de compuestos antibacterianos que son liberados al medio, y que representan uno de los principales avances alcanzados para aumentar la vida útil de productos frescos (Rojas-Graü et al., 2009).

Muy habitualmente se utilizan polisacáridos como material de base para recubrimientos comestibles (Algecira Enciso y Saavedra Hortua, 2017). Entre los polisacáridos habitualmente utilizados para la formulación de películas comestibles, el almidón (Figura 1) y sus derivados han sido ampliamente estudiados, ya que este polímero es abundante en la naturaleza y tiene menor coste que otros materiales alternativos de alta resistencia a la tracción (Teixeira et al. 2009; Carvalho 2008). Almidones de diferentes fuentes como trigo, maíz, papa y yuca se han utilizado, obteniendo, con este último, películas con buenas propiedades de flexibilidad y permeabilidad al oxígeno (Menzel et al., 2019; Muller et al., 2017). Young (1984) cita ejemplos de la década de 1960 utilizando almidón para formar películas, en donde el agua actúa como plastificante. El agua generalmente disminuye la resistencia a la tracción de la película al debilitar las fuerzas intermoleculares (Embuscado y Huber, 2009).

En la formulación de películas comestibles suelen incluirse plastificantes de distinta naturaleza química con el fin de mejorar su flexibilidad y hacerlas menos frágiles (Carvalho 2008; Embuscado and Huber 2009; Talja et al. 2007). La glicerina y los polialcoholes son agentes plastificantes efectivos que mejoran las propiedades de la película, pero por otro lado pueden empeorar las propiedades barrera (Embuscado and Huber 2009, cap 4).

Los ácidos fenólicos son ácidos orgánicos con un anillo aromático y al menos un sustituyente hidroxilo, que forman parte de las distintas rutas metabólicas en vegetales (Figura 2) por lo que son comúnmente encontrados en los tejidos vegetales (Badui Dergal 2006).

El ácido cinámico (C) es un ácido conjugado de un cinamato, monocarboxílico que se encuentra en *Cinnamomum cassia*. Es sólido a temperatura ambiente y ligeramente soluble en agua. Este ácido y sus derivados son capaces de ejercer un importante control del crecimiento bacteriano. Según estudios previos (Malheiro et al. 2018) casi todos sus derivados inhibieron el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus*. Además, la acción modesta contra las células sésiles refuerza su potencial para ser utilizados como aditivos y/o potenciadores de las formulaciones biocidas utilizadas actualmente.

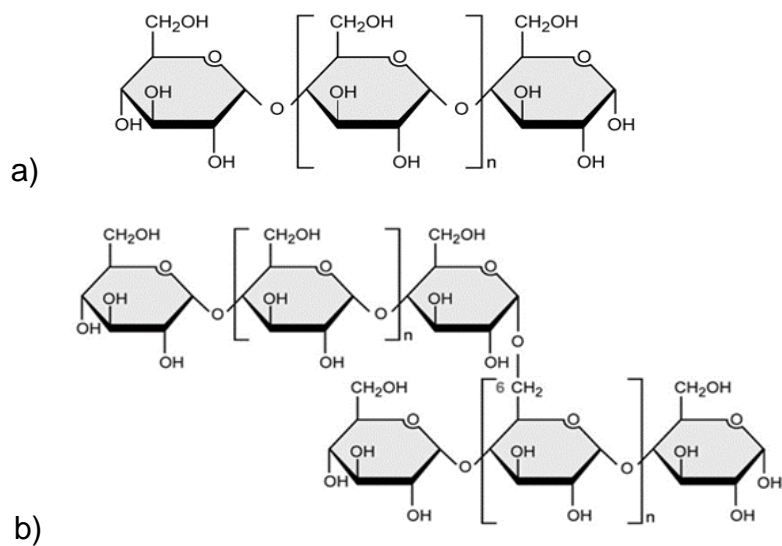


FIGURA 1. Estructuras de amilosa (a) y amilopectina (b)

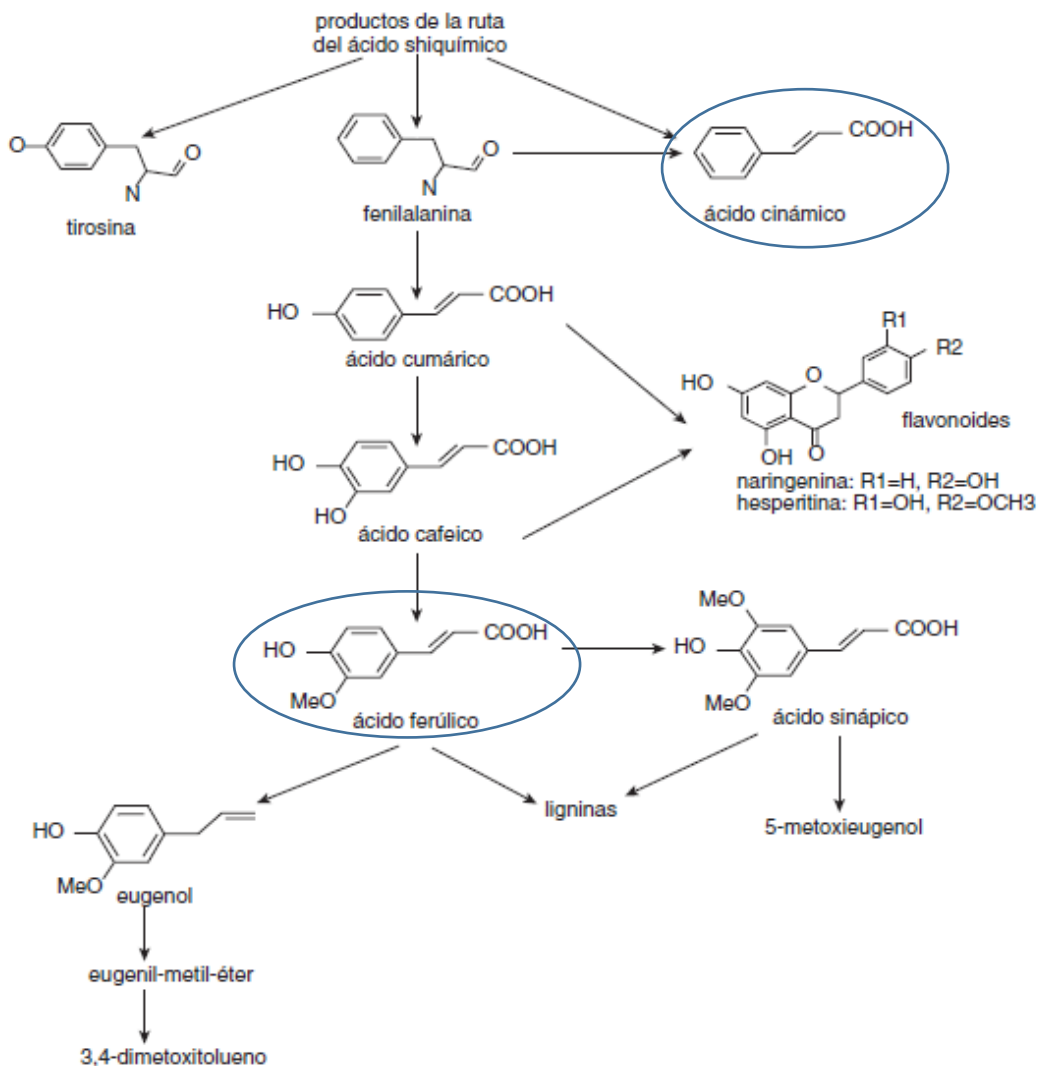


FIGURA 2. Mecanismo de síntesis de ácidos fenólicos, flavonoides y ésteres en el metabolismo de frutas.

El ácido ferúlico (F) es otro ácido fenólico que se encuentra en la pared celular vegetal. Se trata de un ácido hidroxicinámico, formado básicamente por un anillo aromático, un grupo metoxilo en orto al hidroxilo y un grupo carboxílico en posición para con el hidroxilo (Figura 2). En estudios anteriores se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas efectivas, con un riesgo mínimo para desarrollar resistencias (Takahashi et al., 2013). Estudios realizados por Takahashi et al. (2015), demostraron específicamente actividad antibacteriana del ácido ferúlico contra diferentes microorganismos como *L. monocytogenes*.

El ácido ferúlico y cinámico están, además, permitidos como sustancias aromatizantes en la Unión Europea (European Council y EFSA, (1999) y EFSA, (2012)).

El objetivo de este estudio fue la obtención de films biodegradables elaborados a base de almidón de yuca, utilizando glicerol como plastificante, con incorporación de ácido ferúlico y cinámico en diferentes proporciones (1, 2 y 3 %) y el análisis de su actividad antibacteriana contra *E. coli* y *L. innocua* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* con diferentes matrices alimentarias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la elaboración de las películas se utilizó almidón de yuca producido por Asia CO., LDT (Kalasin, Tailandia) y distribuido por Quimidroga S.A. (Barcelona). El glicerol utilizado como plastificante fue suministrado por Panreac Química S.A. (Castellar del Vallés, Barcelona). Los ácidos cinámico y ferúlico se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). Para el acondicionamiento de las películas se utilizó nitrato de magnesio 6 hidratado y cloruro de magnesio 6 hidratado (Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, Barcelona).

Los alimentos utilizados en los ensayos de actividad antimicrobiana (melón fresco y pechuga de pollo) se compraron en un mercado local. Para los ensayos de actividad antimicrobiana, se utilizaron cepas liofilizadas de *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101), que se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universitat de València, España). Para las pruebas *in vitro* se utilizó medio de cultivo agar tríptico de soja (TSA, Scharlab, Barcelona, España) y para la masticación fue necesaria agua de peptona tamponada (Scharlab, Barcelona, España). Para la realización de los recuentos en placa de *L. innocua* se utilizó medio de agar Base Palcam (Scharlab, Barcelona, España) que contenía el suplemento selectivo de Palcam para *Listeria* (Scharlab, Barcelona, España), y para *E. Coli* se utilizó agar Rojo Bilis Violeta (VRB, Agar; Scharlab, Barcelona, España).

2.2 Preparación de las películas

Las películas se prepararon mediante mezclado en fundido y moldeado por compresión. El almidón de yuca se mezcló con glicerol (0.30 g/g de almidón), agregando además los ácidos cinámico y ferúlico en proporciones de 1%, 2% y 3% respecto a la masa total. Adicionalmente, se preparó una formulación control sin activo (S). La Tabla 1 muestra la composición de las películas y la nomenclatura empleada.

TABLA 1. Formulaciones de las películas elaboradas con almidón de yuca, glicerol y ácidos ferúlico y cinámico.

Formulaciones	Almidón	Glicerol	Á. Ferúlico	Á. Cinámico
S	76.9%	23.1%	-	-
SF1	76.2%	22.8%	1.0%	-
SF2	75.4%	22.6%	2.0%	-
SF3	74.6%	22.4%	3.0%	-
SC1	76.2%	22.8%	-	1.0%
SC2	75.4%	22.6%	-	2.0%
SC3	74.6%	22.4%	-	3.0%

Para la homogeneización de las formulaciones se utilizó una variante del método usado por Menzel et al. (2019), introduciendo las muestras en un mezclador interno (Haake PolyLab QC, Thermo Fisher Scientific, Alemania) y homogeneizando a 130 °C y 50 rpm durante 10 min, después de haber precalentado la cámara del mezclador. Una vez obtenidos los pellets se trituraron y se almacenaron. La humedad relativa estándar de acondicionamiento de los films fue 53% (con nitrato de magnesio) a 25 °C, pero las formulaciones con ácidos se almacenaron a 33% (con cloruro de magnesio), puesto que una excesiva humedad daba lugar a pegajosidad.

Se obtuvieron las películas mediante moldeado por compresión tal como describen Muller et al., (2017), utilizando moldes de teflón de aproximadamente 17 cm de diámetro. Se colocaron 4 g de muestra sobre las láminas de acero y se precalentó sin aplicar presión a 160 °C durante 1 minuto. Tras esta etapa, se realizó una compresión de dos pasos manteniendo la misma temperatura: primero a 50 bares durante 2 min, y finalmente a 100 bares durante 6 min. Posteriormente, se aplicó un ciclo de enfriamiento de 3 min para bajar la temperatura a unos 70 °C. Las películas S se mantuvieron acondicionadas a una HR del 53% y las de SF y SC a una HR del 33%, a 25 °C hasta su posterior análisis o uso.

2.3 Análisis fisicoquímico de las matrices alimentarias

Previamente a los ensayos de actividad antimicrobiana, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica de las materias primas seleccionadas como matriz. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas directamente relacionadas con la sensibilidad al crecimiento microbiano (Requena et al., 2019), tales como el pH y la actividad del agua (a_w), se analizaron en cada una de las matrices de alimentos utilizando un medidor de pH con electrodo de punción (Seven Easy™ pH, Mettler Toledo, Suiza) y un medidor de a_w de punto de rocío (Aqualab 4TE, METER FOOD, USA), respectivamente. Los grados Brix también se determinaron en las muestras de fruta (melón), como indicador de madurez, usando un refractómetro (ATAGO™ NAR-3T Abbe, Japón). Para las mediciones de a_w , las muestras de fruta se pelaron y cortaron en trozos pequeños (al igual que el pollo), mientras que, para la determinación de los sólidos solubles totales en la fruta, el jugo de la muestra se obtuvo por licuefacción. Se realizaron un mínimo de 3 medidas en cada ensayo.

2.4 Efecto antibacteriano de películas activas: pruebas *in vitro* e *in vivo*

2.4.1 Elaboración de matrices alimentarias

Para analizar el efecto antimicrobiano de las películas, se utilizó la metodología descrita por Requena et al., (2019). Se seleccionaron matrices alimentarias de diferentes características, con el fin de evaluar la capacidad antibacteriana de las películas en función de la composición del alimento: con alto contenido en proteína (carne de pechuga de pollo), y con alta proporción de carbohidratos (melón fresco cortado).

Los alimentos se manipularon en cabina de flujo laminar en condiciones estériles. Las pechugas de pollo se filetearon y la matriz vegetal fue pelada y cortada en rodajas finas. Se obtuvieron muestras de 10 a 15 g de 55 mm de diámetro de cada alimento, se colocaron en placas de Petri y se aplicó luz UV para su desinfección superficial.

2.4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante la utilización de la metodología descrita por Requena et al., 2019 con una bacteria gram positiva y otra gram negativa. Las cepas liofilizadas de *Listeria innocua* (CECT 910) y *Escherichia coli* (CECT 101) se almacenaron a -25 °C con un 30% de glicerol. Los cultivos bacterianos en fase de crecimiento exponencial se prepararon inoculando las suspensiones de stock microbiano en caldo de triptona y soya TSB, seguido de su incubación a 37 °C durante 24 h. Los inóculos se diluyeron adecuadamente para obtener suspensiones bacterianas de 10⁶ UFC/ml.

El medio de cultivo de agar tríptico de soja, utilizado para pruebas *in vitro*, y las diferentes muestras de alimentos colocadas en placas de Petri (55 mm de diámetro) se inocularon con 100 µl de suspensión de *L. innocua* o *E. coli* y se cubrieron con las diferentes muestras de películas activas del mismo

diámetro (se incluyeron dos muestras por formulación). Las muestras cubiertas con películas S, libres de ácidos, se analizaron como control de película, y se incluyeron muestras sin recubrir (Control) para tener como referencia el crecimiento del inóculo. Las placas de Petri se cerraron con sus tapas, y se incubaron durante 6 días. La incubación se realizó a 10 °C en todos los casos debido al potencial efecto antimicrobiano de las bajas temperaturas trabajando dentro de los límites de la conservación del frío. Los recuentos microbianos en cada muestra se realizaron por duplicado después de 6 días de incubación. Para este fin, cada muestra se homogeneizó en agua de peptona tamponada, durante 2 minutos, utilizando un Stomacher Labblender (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, España) y se diluyó adecuadamente. Los recuentos en placa de *L. innocua* se realizaron en medio de agar Base Palcam, que contenía el suplemento selectivo para *Listeria*, después de la incubación a 37 °C durante 48 h, mientras que el recuento en placa de *E. Coli* se realizó en agar Rojo Bilis Violeta, después de la incubación a 37 °C durante 48 h. Los resultados de los recuentos se expresaron como log UFC/g de matriz alimentaria o TSA.

2.5 Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de confianza del 95%. Para este fin, se utilizó Statgraphics Centurion XVII.II-X64 español para Windows (1982-2014 Statpoint Technologies, Inc.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las matrices alimentarias

Todos los alimentos utilizados son sustratos adecuados para el desarrollo bacteriano en términos de a_w , ya que todas las matrices muestran valores de a_w (Tabla 2) por encima del umbral requerido para que se dé el crecimiento bacteriano, por encima de 0.900 aproximadamente (Madigan et al., 2003). De forma similar, el pH y los °Brix (en el caso del melón) de los alimentos utilizados fue muy cercano a los valores óptimos utilizados por los microorganismos para su crecimiento (Madigan et al., 2003), lo que nos indica que ninguna de estas propiedades fisicoquímicas sería impedimento para que se desarrollaran los microorganismos en cada una de las matrices.

TABLA 2. Valores de pH, actividad de agua (a_w), y °Brix de diferentes matrices alimentarias. Valor medio \pm desviación estándar.

Matriz	pH	a_w	° Brix
Agar	7.145 \pm 0.006	1.0034 \pm 0.0015	-
Pollo	6.037 \pm 0.006	0.9894 \pm 0.0010	-
Melón	5.620 \pm 0.010	0.9913 \pm 0.0008	9.5 \pm 0.7

3.2 Efecto antibacteriano de las películas.

Los resultados de las pruebas *in vitro* frente a *L. innocua* y *E. coli*, además de las pruebas *in vivo* en los dos tipos de alimentos, con alto valor proteico (carne de pechuga de pollo) o con alto contenido en carbohidratos (melón fresco cortado) se dan en la Figura 3 para las muestras control (sin recubrir) y en la Figura 4 para las muestras recubiertas.

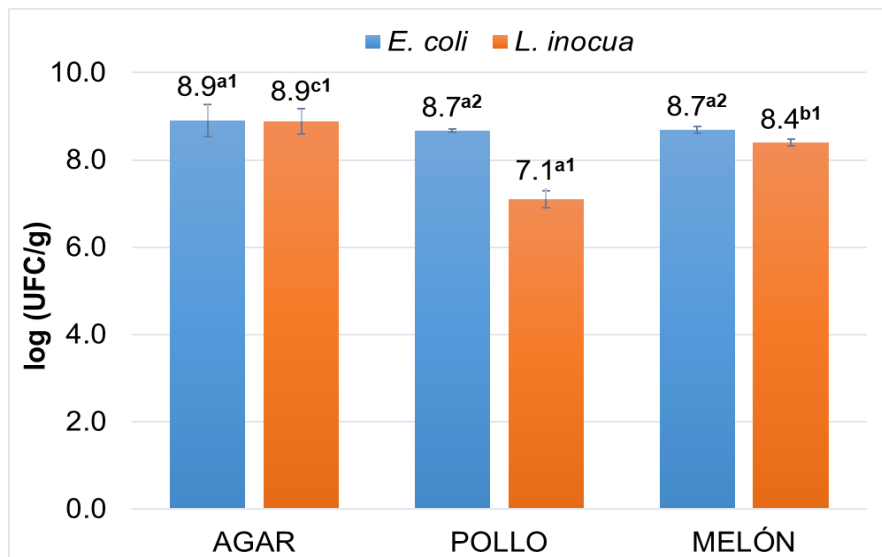


FIGURA 3. Recuento microbiano de *E. coli* y *L. innocua* en los tres sistemas modelo (matrices) sin recubrimiento, después de 6 días de incubación a 10 °C. Se indican los grupos homogéneos (superíndices) con letras (a-c) para el factor matriz y números (1-2) para el factor microorganismo ($p < 0.05$).

Analizando la Figura 3 se puede observar que a la temperatura de incubación utilizada (10 °C) no tuvo un efecto bacteriostático sobre los microorganismos inoculados en el medio de cultivo TSA (el crecimiento promedio fue de 4 log UFC). Ambas bacterias se encuentran dentro del mismo grupo homogéneo por lo que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de ambas bacterias en el agar. Sin embargo, si se compara el crecimiento de ambos microorganismos en las distintas matrices alimentarias, se puede observar que sí hubo diferencias significativas en el crecimiento de *L. innocua* en las diferentes matrices, siendo menor en pechuga de pollo que en melón y ambos menores que el medio de cultivo. Esto podría estar asociado con la diferente composición de los alimentos y los requerimientos nutricionales de cada bacteria que ayudan a su proliferación.

En el caso de *E. coli*, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento en función de las distintas matrices utilizadas.

Este análisis del comportamiento de los microorganismos en las distintas matrices sin recubrimiento y en las condiciones establecidas para simular la refrigeración, permitió tener un punto de partida sobre el cual analizar el efecto inhibitorio de las películas con diferentes concentraciones de activo.

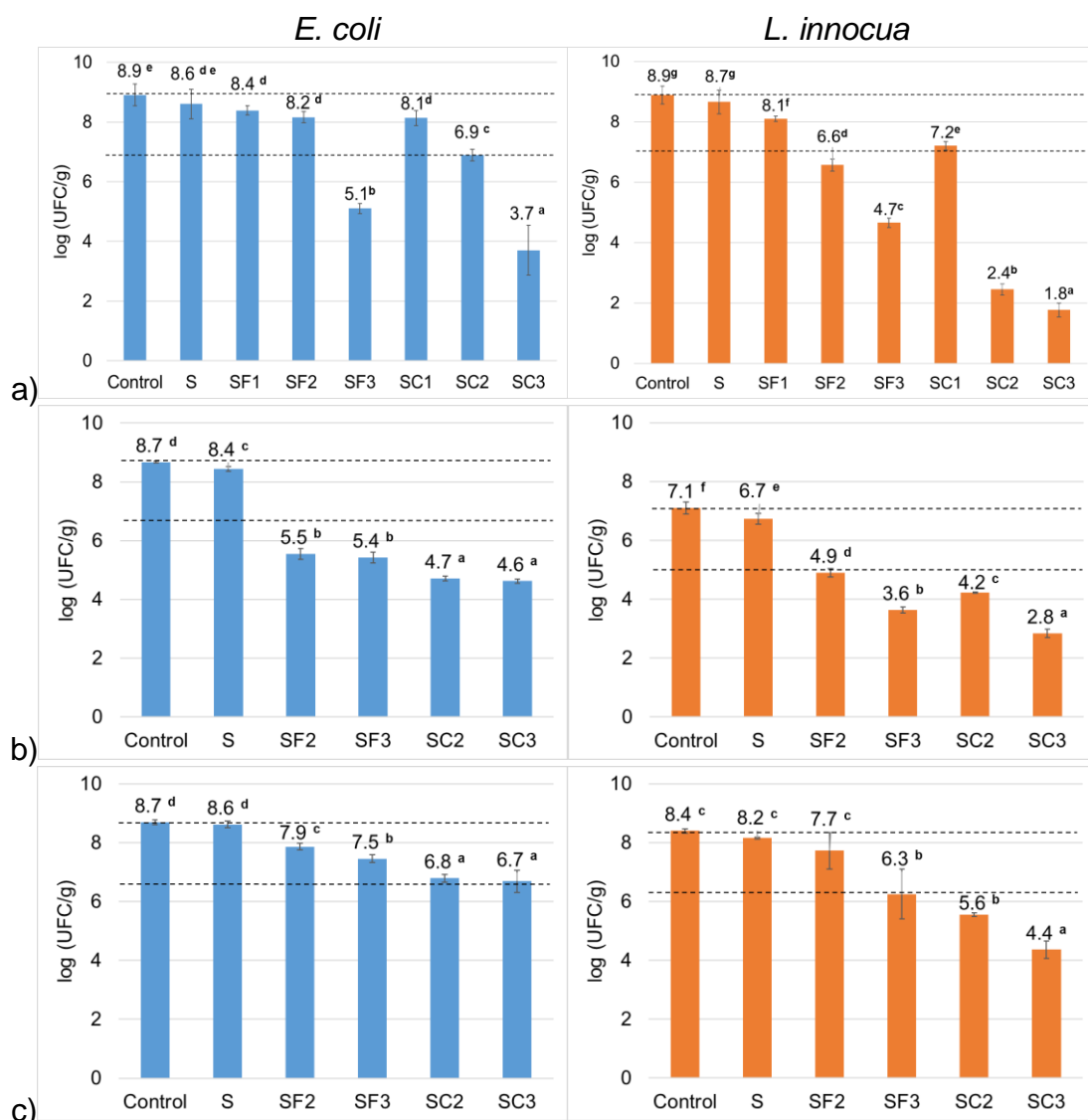


FIGURA 4. Recuentos de *E. coli* y *L. innocua* obtenidos después de 6 días de incubación a 10 °C en TSA (a), pechuga de pollo (b) y melón fresco cortado (c). Control: muestras sin recubrir. Almidón sin activo (S), almidón con 1, 2 y 3% de ácido ferúlico (SF1, SF2 y SF3) y cinámico (SC1, SC2 y SC3). Las líneas de puntos muestran diferencia de 2 log respecto al control. Letras a-g indican grupos homogéneos ($p < 0.05$).

Los ensayos *in vitro* de las muestras recubiertas con las películas con diferentes concentraciones de C y F (Figura 4 (a)) mostraron que al 1% hubo disminución significativa del crecimiento bacteriano, pero fue inferior a 2 logaritmos que es lo habitualmente considerado notable en términos microbianos. Por este motivo en las matrices alimentarias se probaron únicamente las películas con 2 y 3 % de activo. En las pruebas en agar, las películas más efectivas fueron las de mayor contenido en C, las cuales presentaron una reducción del crecimiento de más de 4 log. (Figura 4).

Adicionalmente, se observó que las películas con activos fueron más eficaces inhibiendo el crecimiento de *L. innocua* que el de *E. coli*. Como se

muestra en la Figura 4, hubo una mayor actividad inhibitoria de las formulaciones con C para ambas cepas en comparación con las de F. No obstante, otros autores (Miyague et al. 2015) reportaron una mayor sensibilidad de las bacterias al F (menor concentración mínima inhibitoria: MIC) que al cinámico. Esta diferencia podría deberse a los diferentes mecanismos de liberación y migración de los ácidos desde las películas de almidón hacia las matrices, lo cual conllevaría una diferente concentración del activo en el medio. De hecho, para estos cultivos, también se ha detectado en otros estudios paralelos valores de las MICs inferiores para el F que para el C. Sin embargo, pese a que el F tiene una menor MIC no se obtuvo una mayor acción efectiva en las diferentes matrices, lo que indica que se libera con mayor dificultad del film que el C. En resumen, en el estudio *in vitro* se observó una mayor efectividad de los films con C y un efecto antibacteriano mayor en *L. innocua* que en *E. coli*, siendo esta última menos sensible a la concentración de los activos en el film.

En la Tabla 3 se muestran los valores de reducción logarítmica obtenidos para el crecimiento de *E. coli* y *L. innocua* para las diferentes películas utilizando TSA y las matrices alimentarias. La reducción (log UFC) se da con respecto al control sin recubrir en la correspondiente matriz.

TABLA 3. Valores de reducción logarítmica (respecto a las muestras control) de UFC de *E. Coli* y *L. innocua* en muestras recubiertas con películas. Se destacan en negrita los valores superiores a 2 log.

	MATRICES	AGAR	POLLO	MELÓN
S	<i>E. coli</i>	0.3 ± 0.5 ^{a1}	0.22 ± 0.08 ^{a1}	0.07 ± 0.12 ^{a1}
	<i>L. innocua</i>	0.2 ± 0.4 ^{a1}	0.4 ± 0.2 ^{a1}	0.07 ± 0.12 ^{a1}
SF1	<i>E. coli</i>	0.5 ± 0.2 ¹	-	-
	<i>L. innocua</i>	0.78 ± 0.09 ²	-	-
SF2	<i>E. coli</i>	0.7 ± 0.2 ^{a1}	3.1 ± 0.2^{b2}	0.84 ± 0.11 ^{a1}
	<i>L. innocua</i>	2.3 ± 0.2^{b2}	2.2 ± 0.2^{b1}	0.7 ± 0.6 ^{a1}
SF3	<i>E. coli</i>	3.8 ± 0.2^{c1}	3.2 ± 0.2^{b1}	1.24 ± 0.13 ^{a1}
	<i>L. innocua</i>	4.2 ± 0.2^{b2}	3.47 ± 0.10^{b1}	2.1 ± 0.8^{a1}
SC1	<i>E. coli</i>	0.8 ± 0.2 ¹	-	-
	<i>L. innocua</i>	1.68 ± 0.14 ²	-	-
SC2	<i>E. coli</i>	2.0 ± 0.2^{a1}	3.96 ± 0.09^{b2}	1.90 ± 0.13 ^{a1}
	<i>L. innocua</i>	6.4 ± 0.2^{b2}	2.88 ± 0.02^{a1}	3.3 ± 0.5^{a2}
SC3	<i>E. coli</i>	5.2 ± 0.8^{c1}	4.05 ± 0.08^{b1}	2.0 ± 0.4^{a1}
	<i>L. innocua</i>	7.1 ± 0.2^{b2}	4.26 ± 0.14^{a2}	6 ± 2^{ab2}

Los superíndices (a-c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en función de la matriz alimentaria empleada. Los superíndices (1,2) indican diferencias significativas en función del microorganismo.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la concentración de activo en las películas, y los diferentes comportamientos que pueden tener los microorganismos frente a estos compuestos, teniendo en cuenta su crecimiento en las mismas condiciones.

3.2.1 Efecto antibacteriano de películas activas en alimentos ricos en proteínas

En la Figura 4 (b) se muestran los recuentos microbianos de *E. coli* y *L. innocua* obtenidos en pechuga de pollo fresco recubierta con las diferentes formulaciones. Al comparar los resultados obtenidos en esta matriz con las pruebas *in vitro* (Figura 4 (a)), cabe mencionar que las películas tuvieron un comportamiento similar en cuanto al poder inhibitorio sobre los microorganismos. Sin embargo, en los tratamientos con C para *L. innocua* en la matriz proteica hubo un crecimiento ligeramente mayor, comparado con el obtenido con el TSA. Además, se puede observar que en el recuento de *E. coli* no hubo diferencias significativas entre las muestras con 2% y 3% de cada activo estudiado, observándose de nuevo la menor sensibilidad de *E. coli* a la concentración del activo en el film, de manera más acusada que en el medio de cultivo. Esto podría estar asociado a las interacciones del activo con la matriz proteica que reducen su concentración efectiva para el efecto antibacteriano. Se han descrito interacciones de los compuestos fenólicos con diferentes matrices que limitan su efectividad, dependiendo de la composición del alimento (Requena et al., 2019)

Takahashi et al., (2013) encontraron en un estudio realizado en matrices como queso y salmón ahumado, que el ácido ferúlico tuvo capacidad para inhibir selectivamente *L. monocytogenes*, permitiendo su control en alimentos listos para consumir, donde la mayoría de las otras bacterias no sobreviven a tiempos prolongados y bajas temperaturas; mencionando además que el F tienen una relativa ineficacia contra *Escherichia coli* O157: H7 a bajas concentraciones.

Adicionalmente se pudo observar que en el caso de *L. innocua* las películas S, SC2 y SC3 en la matriz de pollo proporcionaron una inhibición similar a la ocurrida en la matriz vegetal (mismo grupo homogéneo), en contraposición a los resultados obtenidos con las películas de F (SF2 y SF2) en las que se observaron diferencias significativas entre las dos matrices (Tabla 3).

3.2.2 Efecto antibacteriano de películas activas en alimentos ricos en carbohidratos.

La Figura 4 (c) muestra también el crecimiento bacteriano en la matriz de melón, donde se observan las mismas tendencias en cuanto a la inhibición del crecimiento, pero con un efecto más atenuado que en la matriz de carne, lo que podría indicar un mayor efecto secuestrante de la matriz sobre los activos por una mayor interacción de los mismos con los compuestos del melón. Requena et al. (2019) también encontraron un efecto antibacteriano muy limitado de los compuestos fenólicos en esta matriz, a pesar de la alta tasa de liberación de estos activos en la misma. No obstante, para el C se obtuvieron inhibiciones superiores a 2 log UFC con los films activos para ambas bacterias, llegando a 6 log UFC en el caso de *L. innocua*, con la mayor concentración de C. Con F, las reducciones en el crecimiento fueron menores,

y solo se superó la reducción de 2 log UFC en el caso del 3 % de F con *L. innocua* (Tabla 3).

Los resultados de inhibición del crecimiento de *Listeria* obtenidos con los ácidos fenólicos son muy relevantes por ser la *Listeria* un microorganismo involucrado en muchos casos graves de contaminación de alimentos en los últimos años, siendo una de las principales bacterias causante de enfermedades transmitidas por lo alimentos (ETA) con alta tasa de letalidad. Se ha demostrado que en muestras de alimentos vegetales *L. monocytogenes* puede crecer sin una fase de retraso prolongada después de ser congelada, incluso a temperaturas de refrigeración (4 °C) (EFSA y ECDC, 2018) y persistir en el entorno de procesamiento de alimentos con alto riesgo de contaminación cruzada en diferentes líneas de producción de alimentos (EFSA et al. 2018). Los resultados obtenidos en cuanto a su control en el crecimiento sobre matrices alimentarias pueden ser muy prometedores para la prevención de estas enfermedades.

4. CONCLUSIONES

Los films de almidón con ácidos cinámico o ferúlico fueron efectivos en el control del crecimiento de *L. Innocua* y *E. coli* en ensayos *in vitro* y en las matrices de carne de pollo y melón cortado. La efectividad fue afectada por la concentración y tipo de activo y por el tipo de matriz alimentaria. Fue necesaria una concentración del activo en el film del 2% para asegurar una actividad significativa en las matrices alimentarias desde el punto de vista antimicrobiano (2 log UFC de reducción). La acción antibacteriana con los films de almidón fue mayor para el ácido cinámico que para el ferúlico, tanto en los ensayos *in vitro*, como en las matrices de carne de pollo y melón cortado. Así mismo, la acción antilisteria fue mayor que la actividad frente a *E coli*, que fue además menos sensible a la concentración de activo. La matriz de carne fue más sensible a la acción de los antibacterianos que la matriz vegetal debido probablemente a las diferentes interacciones específicas de los activos con los componentes de la matriz. La actividad en otros alimentos con diferente composición podría cambiar en función de las interacciones específicas.

Los resultados obtenidos poseen un gran potencial en el campo del envasado o recubrimiento activo de alimentos, con la utilización de polímeros biodegradables y comestibles como el almidón, que puedan tener un efecto protector tanto fisicoquímica como microbiológicamente, con la incorporación de ácidos fenólicos, como el ferúlico o el cinámico.

Los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición de crecimiento de *L. innocua* en muestras de la pechuga de pollo y el melón fresco cortado son de gran interés para el desarrollo de recubrimientos/envases biodegradables con aditivos naturales utilizables en la conservación y aumento de la vida útil de los alimentos.

5. REFERENCIAS

- Algecira Enciso, Néstor Ariel, and Nataly Saavedra Hortua. 2017. "Evaluación de Películas Comestibles de Almidón de Yuca y Proteína Aislada de Soya En La Conservación de Fresas." *Nova* 8 (14): 171. <https://doi.org/10.22490/24629448.448>.
- Armentano, I., N. Bitinis, E. Fortunati, S. Mattioli, N. Rescignano, R. Verdejo, M. A. Lopez-Manchado, and J. M. Kenny. 2013. "Multifunctional Nanostructured PLA Materials for Packaging and Tissue Engineering." *Progress in Polymer Science* 38 (10–11): 1720–47. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.010>.
- Badui Dergal, Salvador. 2006. *Química de Alimentos. Química de Los Alimentos*. Cuarta Edi. México: Pearson Educación.
- Carvalho, Antonio J.F. 2008. "Starch: Major Sources, Properties and Applications as Thermoplastic Materials." *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 321–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00015-6>.
- Embuscado, Milda E., and Kerry C. Huber. 2009. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer Science+Business Media, LLC 2009.
- European Council, and (EFSA). 1999. "COMMISSION DECISION of 23 February 1999. Adopting a Register of Flavouring Substances Used in or on Foodstuffs Drawn up in Application of Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996." *Official Journal of the European Union*, 1–75.
- (EFSA) European Food Safety Authority. 2012. "Commission Implementing Regulation (EU) No 872/2012." *Official Journal of the European Union*, no. 2232.
- (EFSA), European Food Safety Authority, and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2018. "Multi-country Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serogroup IVb, Multi-locus Sequence Type 6, Infections Linked to Frozen Corn and Possibly to Other Frozen Vegetables – First Update." *EFSA Supporting Publications* 15 (7). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1448>.
- (EFSA), European Food Safety Authority, Ana Allende, Léna Barre, Liesbeth Jacxsens, Ernesto Liebana, Winy Messens, Eleonora Sarno, and Maria Teresa da Silva Felicio. 2018. "Urgent Scientific and Technical Assistance to Provide Recommendations for Sampling and Testing in the Processing Plants of Frozen Vegetables Aiming at Detecting *Listeria Monocytogenes*." *EFSA Supporting Publications* 15 (7). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1445>.
- Galanakis, Charis M. 2018. "Phenols Recovered from Olive Mill Wastewater as Additives in Meat Products." *Trends in Food Science and Technology* 79 (February): 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.010>.
- Gu, Chun Hong, Jia Jun Wang, Yang Yu, Hui Sun, Ning Shuai, and Bing Wei. 2013. "Biodegradable Multilayer Barrier Films Based on Alginate/Polyethyleneimine and Biaxially Oriented Poly(Lactic Acid)." *Carbohydrate Polymers* 92 (2): 1579–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.004>.
- Madigan, Michael, Jhon Martinko, and Jack Parker. 2003. *Brock. Biología de Los Microorganismos*. 10th ed. Pearson education.
- Malheiro, J F, J Maillard, F Borges, and M Simões. 2018. "Evaluation of Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid Derivatives in Microbial Growth Control." *International Biodeterioration and Biodegradation* 141 (April 2018): 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.003>.
- Menzel, Carolin, Chelo González-Martínez, Amparo Chiralt, and Francisco Vilaplana. 2019. "Antioxidant Starch Films Containing Sunflower Hull Extracts." *Carbohydrate Polymers* 214 (March): 142–51. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.022>.
- Miyague, Lye, Renata E.F. Macedo, Giuseppe Meca, Richard A. Holley, and Fernando B. Luciano. 2015. "Combination of Phenolic Acids and Essential Oils against *Listeria Monocytogenes*." *LWT - Food Science and Technology* 64 (1): 333–36. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.055>.
- Moreno, Olga. 2017. "Doctoral Thesis Starch-Protein Active Films for Food Preservation," 1–14.
- Muller, Justine, Chelo González-Martínez, and Amparo Chiralt. 2017. "Poly(Lactic) Acid (PLA) and Starch Bilayer Films, Containing Cinnamaldehyde, Obtained by Compression Moulding." *European Polymer Journal* 95 (June): 56–70.

- <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.019>.
- PNUMA, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 2019. "Combatir La Contaminación de Los Productos de Plástico Desechables." *Cuarta Asamblea de Las Naciones Unidas Sobre El Medio Ambiente*, 1–24. <https://www.cancilleria.gov.co/programa-las-naciones-unidas-medio-ambiente-pnuma>.
- Requena, Raquel. 2018. "Doctoral Thesis Multilayer Biodegradable Active Films Based on Phbv for Food Packaging," no. September.
- Requena, Raquel, María Vargas, and Amparo Chiralt. 2019. "Eugenol and Carvacrol Migration from PHBV Films and Antibacterial Action in Different Food Matrices." *Food Chemistry* 277 (October 2018): 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.093>.
- Rojas-Graü, M. Alejandra, Gemma Oms-Oliu, Robert Soliva-Fortuny, and Olga Martín-Belloso. 2009. "The Use of Packaging Techniques to Maintain Freshness in Fresh-Cut Fruits and Vegetables: A Review." *International Journal of Food Science and Technology* 44 (5): 875–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01911.x>.
- Ruiz, Raúl, and Esperanza Torija. 2013. "Riesgos y Beneficios de Los Aditivos Alimentarios." *Elsevier*, 1–7. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-riesgos-beneficios-los-aditivos-alimentarios-13760>.
- Takahashi, Hajime, Marina Kashimura, Hiroaki Koiso, Takashi Kuda, and Bon Kimura. 2013. "Use of Ferulic Acid as a Novel Candidate of Growth Inhibiting Agent against *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Food." *Food Control* 33 (1): 244–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.013>.
- Takahashi, Hajime, Tomomi Takahashi, Satoko Miya, Haruka Yokoyama, Takashi Kuda, and Bon Kimura. 2015. "Growth Inhibition Effects of Ferulic Acid and Glycine/Sodium Acetate On *Listeria Monocytogenes* in Coleslaw and Egg Salad." *Food Control* 57: 105–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.037>.
- Talja, Riku A., Harry Helén, Yrjö H. Roos, and Kirsi Jouppila. 2007. "Effect of Various Polyols and Polyol Contents on Physical and Mechanical Properties of Potato Starch-Based Films." *Carbohydrate Polymers* 67 (3): 288–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.019>.
- Teixeira, Eliângela de M., Daniel Pasquini, Antônio A.S. Curvelo, Elisângela Corradini, Mohamed N. Belgacem, and Alain Dufresne. 2009. "Cassava Bagasse Cellulose Nanofibrils Reinforced Thermoplastic Cassava Starch." *Carbohydrate Polymers* 78 (3): 422–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.034>.