



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (IATA)

PELÍCULAS DE ZEÍNA CON LAE Y CATEQUINA PARA LA PROTECCIÓN BIOACTIVA DE ALIMENTOS PERECEDEROS ENVASADOS

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Presentado por:

Narsés Peris Jiménez

Directores:

Dr. Rafael Gavara Clemente

Dra. Pilar Hernández Muñoz

Codirector:

Dra. Gracia López Carballo

Centro:

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

Valencia, Junio 2014

PELÍCULAS DE ZEÍNA CON LAE Y CATEQUINA PARA LA PROTECCIÓN BIOACTIVA DE ALIMENTOS PERECEDEROS ENVASADOS.

Narsés Peris Jiménez¹⁻², Gracia López-Carballo¹, Virginia Muriel Galet¹, Pilar Hernández-Muñoz¹, Rafael Gavara Clemente¹⁻².

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad antimicrobiana y antioxidante de un envase activo basado en la aplicación de un recubrimiento de zeína al que se le añadió un 5 y 10% de monohidrocloreto de éster etílico de N α -lauroil-L-arginina y un 5% de catequina sobre películas de ácido poliláctico. Las películas desarrolladas se han aplicado en el envasado de una bebida de soja y de un zumo de naranja con la finalidad de extender la vida útil, reducir el posible riesgo microbiológico y prevenir la oxidación del alimento mejorando su seguridad y calidad.

PALABRAS CLAVE: envase activo, recubrimiento, antimicrobiano, antioxidante, LAE, catequina, zeína, PLA, soja, zumo de naranja.

RESUM

L'objectiu del present treball va ser estudiar la capacitat antimicrobiana i antioxidant d'un envàs actiu basat en l'aplicació d'un recobriment de zeïna que incorporen un 5 y 10% de monohidrocloreto d'èster etílic de N α -lauroil-L-arginina i un 5% de catequina sobre pel·lícules de àcid polilàctic. Les pel·lícules desenvolupades van aplicar-se en l'envasament d'una beguda de soja i de un suc de taronja amb la finalitat d'augmentar la vida útil, reduir el possible risc microbiològic i prevenir l'oxidació de l'aliment millorant la seua seguretat i qualitat.

PARAULES CLAU: envàs actiu, recobriment, antimicrobià, antioxidant, LAE, catequina, zeïna, PLA, soja, suc de taronja.

ABSTRACT

The aim of the present work was to study the antimicrobial and antioxidant capacity of an active packaging based on polylactic acid films with a zein coating containing 5 and 10% N α -Lauroyl arginate ethyl and 5% catechin. The developed films were applied in the packaging of soy drink and of orange juice in order to extend their shelf life, to reduce potential microbiological risk and to prevent their oxidation improving the safety and quality of the food products.

KEYWORDS: active packaging, film coating, antimicrobial, antioxidant, LAE, catechin, zein, PLA, soy, orange juice.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino. 7. 46980. Paterna, Valencia. España.

² Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022. Valencia. España.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos se han convertido en una familia de materiales que compite con éxito con el resto de materiales, gracias a su gran versatilidad y capacidad de adaptación a las necesidades del producto a diseñar. Los materiales poliméricos presentan una amplia variedad de aplicaciones en diferentes sectores, incluida la industria alimentaria, y especialmente los envases. Sin embargo, la acumulación de residuos plásticos procedente de la industria y de baja biodegradabilidad es una de las grandes preocupaciones medioambientales actuales. Una alternativa para reducir el problema medioambiental que se genera por el uso de plásticos no biodegradables es el reciclado pero supone un elevado gasto energético por lo que muchas veces no resulta rentable.

Con el objetivo de minimizar el impacto ambiental de los envases plásticos destinados a la conservación de alimentos, se están desarrollando nuevos envases a partir de fuentes renovables y que presentan biodegradabilidad. Se denomina bioplástico a aquel material con características viscoelásticas procedente de fuentes renovables (polímeros naturales procedentes de biomasa o polímeros sintéticos fabricados con monómeros naturales). Entre estos, destacan los agropolímeros o biopolímeros procedentes de subproductos de la industria agrícola como pueden ser: azúcar, almidón, celulosa, patatas, cereales, melaza, aceite de soja, maíz, etc. Los biopolímeros son degradables por organismos vivos (hongos, bacterias o algas), a diferencia de los plásticos convencionales, derivados del petróleo. De forma similar a los plásticos en general, los bioplásticos tampoco constituyen una única clase de polímero sino una familia de materiales con diferentes propiedades y un amplio rango de aplicaciones. La formación y estudio de propiedades de películas basadas en agroproteínas han sido ampliamente estudiadas (Gontard y Guilbert, 1994; Krochta y DeMulder, 1997; Cuq *et al.*, 1998). Además de los estudios realizados con agroproteínas de interés industrial como el gluten de trigo, la zeína de maíz y las proteínas de soja, existe gran diversidad de estudios centrados en el desarrollo de bioplásticos y recubrimientos comestibles a partir de proteínas animales como la gelatina, la proteína del suero de la leche, la queratina, etc.

Los materiales poliméricos han favorecido que los envases se encuentren en una evolución continua y han supuesto la base para el desarrollo de nuevas tecnologías de envasado, como es la del envasado activo. El envasado activo se define como un sistema alimento/envase/entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la seguridad y la calidad de los alimentos y aumentar su vida útil (Catalá y Gavara, 2001). Los principios del envase activo se basan en las propiedades intrínsecas del propio polímero empleado como material de envase o en la introducción de sustancias específicas dentro del polímero con el propósito de que interaccionen beneficiosamente con el alimento (Catalá y Gavara, 2001).

Los principales objetivos del envasado son disminuir o retrasar el deterioro de los alimentos, protegiéndolos frente a daños físicos y

ambientales, e informando al consumidor de su composición, modo de empleo, caducidad, etc. No obstante, algunos procesos de deterioro pueden continuar tras el envasado como ocurre con la oxidación o el deterioro microbiológico que pueden limitar la vida útil del producto. El envasado activo con incorporación de agentes antimicrobianos y antioxidantes puede proporcionar una posible solución a estos problemas con la finalidad de mantener la calidad del producto y aumentar la vida útil del mismo.

Para muchos alimentos el propio envase define la tecnología de conservación, ya que la efectividad del envase es determinante en el control del deterioro químico y microbiológico del producto, así como de los cambios físico-químicos (sabor, aroma, color, textura, etc.) que determinan su calidad sensorial. Con la demanda de alimentos más frescos, existe una tendencia a acortar o eliminar tratamientos térmicos que afecten a la calidad del alimento. Para mantener una adecuada vida útil, se está imponiendo la tecnología de barreras que trata de estabilizar los alimentos mediante la combinación de tecnologías. La tecnología de envasado activo es una de estas barreras que puede alargar la vida incluso una vez los alimentos ya han sido abiertos. En su desarrollo y diseño, el empleo de bioplásticos como material activo constituye una excelente opción.

En el presente trabajo el ácido poliláctico (PLA) y la zeína fueron seleccionados como material de envase con la incorporación de un agente antimicrobiano, monohidrocloruro de éster etílico de $N\alpha$ -lauroil-L-arginina (LAE) y un agente antioxidante, catequina.

PLA es un biopolímero obtenido exclusivamente de recursos renovables, como el maíz y el azúcar, tras un proceso de polimerización controlada de ácido láctico. Sus características de transparencia, inocuidad, biodegradabilidad y facilidad de procesamiento lo convierten en un polímero idóneo para el envasado alimentario (Lim *et al.*, 2008).

El maíz puede ser fraccionado para producir almidón, fibra, aceite y proteínas en formas relativamente puras. El grano de maíz contiene un 9-12% de proteínas con respecto al peso del grano, y la mitad de este porcentaje es una proteína obtenida como subproducto industrial llamada zeína. Debido a que es insoluble en agua, la zeína se usa en muchos productos tales como recubrimientos, plásticos, textiles, y adhesivos. Dadas sus propiedades biológicas, las nuevas aplicaciones de la zeína se están enfocando a la administración de fármacos, la producción de suturas degradables, y la generación de plásticos biodegradables entre otras (Anderson y Lamsal, 2011).

La zeína es insoluble en agua, excepto en presencia de alcohol, altas concentraciones de urea, altas concentraciones de álcali (pH superior a 11) o con detergentes aniónicos. Esto es debido a su composición de aminoácidos. La zeína es particularmente rica en ácido glutámico (21-26%), leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%), pero deficiente en aminoácidos básicos y ácidos (Shukla, 1992; Sanghoon Kim, 2010).

Para evitar la elevada fragilidad de las películas proteicas e impartir flexibilidad y facilitar su manipulación, es primordial el empleo de agentes plastificantes. En el presente trabajo se han seleccionado dos conocidos agentes plastificantes, ácido oleico y glicerol, de diferente polaridad. La disminución de fuerzas intermoleculares entre cadenas polipeptídicas favorece la flexibilidad de las cadenas, favoreciendo así su movilidad, y mejorando el comportamiento mecánico de la película final (Hernández *et al*, 2004).

El LAE es uno de los compuestos antimicrobianos aplicables en alimentos más potentes, con un amplio espectro de actividad (Bakal y Díaz, 2005). Ha sido clasificado como GRAS (Generally Recognised as Safe) por la FDA (Food Drugs Administration) para su uso en alimentos así como aditivo alimentario. La alta actividad antimicrobiana de LAE se ha atribuido a su acción sobre las membranas citoplasmáticas de los microorganismos, donde altera sus procesos metabólicos sin llegar a causar lisis celular (Rodríguez, 2004). Se han realizado estudios que muestran que el LAE, una vez ingerido, no es tóxico puesto que se metaboliza rápidamente en forma de aminoácidos de origen natural, principalmente arginina y ornitina (Ruckman *et al.*, 2004). Algunos autores han estudiado el uso del LAE como agente antimicrobiano en productos alimentarios (Luchansky *et al.*, 2005; Martin *et al*, 2009.; Soni *et al*, 2010; Taormina y Dorsa, 2009). Sin embargo, la información disponible sobre su actividad antimicrobiana cuando se aplica a través de un sistema de envasado es muy limitada (Bonnaud *et al.*, 2010; Becerril *et al.*, 2012).

Los antioxidantes se aplican a los alimentos con la finalidad de disminuir los procesos de oxidación. Entre los posibles antioxidantes naturales de uso alimentario se encuentran los extractos de plantas y aceites esenciales. Éstos se pueden vehiculizar o encapsular en polímeros comestibles biodegradables como los polisacáridos (Bonilla *et al.*, 2012). La catequina pertenece a la familia de los flavonoides, que son polifenoles naturales presentes en los vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza, y su actividad antioxidante está ampliamente estudiada (Gordon y Roedig-Penman, 1998; Pedrielli *et al.*, 2001; Fukuhara *et al.*, 2002; Martínez-Florez *et al.*, 2002)

El desarrollo de películas de PLA/zeína con ácido oleico o glicerol basado en la incorporación de LAE y catequina permitirán obtener un envase activo que, además de ser sostenible con el medio ambiente, pueda adaptarse a las necesidades de procesado de la industria contribuyendo a la reducción de la carga microbiana y evitando la oxidación del alimento, mejorando así la seguridad y calidad del alimento y contribuyendo a un aumento de la vida útil del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Ácido poliláctico biorientado (PLA) de 25 µm de espesor. Q4 Packaging Systems, S.L.
- Zeína desodorizada; Kobayashi perfumery Co., L.T.D. (Japan).
- Monohidrocloreto de éster etílico de N-lauroil-L-arginina (LAE). Vedeqsa, S.A. (Barcelona, España).
- Glicerol. VWR Internacional S.A.S. (France)
- Ácido oleico. Aldrich Chemistry, (USA).
- Catequina hidrato. Fluka Analytical, (Barcelona, España).
- Trolox. Sigma Aldrich, (Barcelona, España).
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). Agilent 1200 Series, Micron Analítica, (España).
- Baño atemperado Unitronic Vaivén, cod.: 6032011. JP Selecta S.A., Unitronic, (Barcelona, España).
- Espectrofotómetro UV-Visible Agilent 8453 Spectroscopy; Agilent Technologies, (España).
- Termoselladora Sealboy Magneta 420 SBM. Audition Elektro, (Netherlands).
- Autoclave Raypa, (Barcelona, España).
- Placas Petri Biostar Plus, (Telsar, Barcelona, España).
- Cepas bacterianas: bacteria Gram positiva, *Listeria innocua* CECT 910T (ATCC 33090); bacteria Gram negativa *Salmonella enterica* CECT 4300 (ATCC 13076); Colección Española de Cultivos Tipo, (Valencia, España).
- Medios de cultivo microbiológico deshidratados: agar Mueller-Hinton (MHA), caldo de Mueller-Hinton (MHB), caldo de tripton y soja (TSB), agar de recuento de placa (PCA), agar de patata dextrosada (PDA), agua peptonada tamponada, verde brillante agar. Scharlab, (Barcelona, España).
- Medio de cultivo microbiológico deshidratado agar de Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Glucosa A; de Fluka Analytical, (Madrid, España).
- Medio de cultivo microbiológico deshidratado agar de man, rogosa y shape (MRS agar); de LabM, (Reino Unido).
- Medio de cultivo microbiológico deshidratado agar Palcam Listeria (*Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Mannitol*), Scharlab, (Barcelona, España).
- Suplemento PALCAM selectivo para Listeria. Baktokit®, (Barcelona, España).
- Microscopio electrónico de barrido: HITACHI S 4100.
- Bebida de soja comercial, 1 litro, (Girona, España).
- Zumo de naranja casero, naranjas variedad *navel lane late*.

Métodos

Preparación de películas y bolsas de zeína.

Se prepararon películas de zeína, con glicerol o ácido oleico como agentes plastificantes, conteniendo LAE al 5 y 10% con respecto al peso de zeína como agente antimicrobiano y/o catequina al 5% con respecto al peso de zeína como agente antioxidante. También se prepararon películas de ácido poliláctico (PLA) recubiertas de zeína, con glicerol o ácido oleico como agentes plastificantes, conteniendo LAE al 5 y 10% con respecto al peso de zeína como agente antimicrobiano, o catequina al 5% con respecto a la zeína como agente antioxidante y con la combinación de ambos agentes (antimicrobiano y antioxidante). Como control se obtuvieron películas con cada uno de los plastificantes sin adición de agentes activos.

Para elaborar las películas de zeína con agente antimicrobiano y/o antioxidante se preparó una disolución de zeína al 16% en peso sobre una base etanol:agua en proporción 80:20. La disolución se calentó a 80°C durante una hora en agitación constante. Tras este tiempo, se disminuyó la temperatura a 37°C y se añadió el plastificante (glicerol al 15% o ácido oleico al 30% sobre el peso de zeína), el agente antimicrobiano (5 o 10% de LAE) y/o el antioxidante (5% de catequina) manteniendo la agitación constante durante 15 minutos.

Las películas de zeína se obtuvieron mediante la técnica de extensión y evaporación del solvente o *casting*. Para ello, 7 g de la disolución obtenida se extendió de forma homogénea con la ayuda de una varilla de extensión de 100 µm de paso sobre una película de polipropileno (PP) sujeta con cinta adhesiva a una placa de vidrio y se introdujo durante 2 minutos bajo un túnel de secado por aire caliente dotado con 5 lámparas de 250 W cada una y un ventilador. Una vez seca la capa se pudo despegar con facilidad la película de zeína de la de PP. Las películas de zeína presentaron un espesor de 12 µm.

Asimismo, la aplicación del recubrimiento de zeína sobre la película de PLA se efectuó por el mismo método de *casting*, donde 7 g de la disolución de zeína se extendieron sobre la película de PLA y tras el secado se obtuvieron películas de PLA/zeína con un espesor de 37 µm aproximadamente, de los cuales 12 µm correspondieron al espesor del recubrimiento de zeína, ambas capas se quedaron perfectamente adheridas. Con esta película bicapa se prepararon bolsas de 16x5 cm (80 cm²) con el recubrimiento de zeína en su cara interna para su utilización en ensayos de envasado utilizando para ello una termoselladora.

Todas las películas desarrolladas se almacenaron en un desecador con gel de sílice a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Estudio de liberación de LAE de las películas de PLA/zeína.

El estudio de liberación de LAE se realizó a 23°C en a) etanol al 10% y b) ácido acético al 3%, empleados como simulantes alimentarios para

alimentos hidrofílicos y para alimentos hidrofílicos con $\text{pH} \leq 4,5$ respectivamente, de acuerdo con la legislación europea (Reglamento (UE) N° 10/2011).

Se introdujeron 20 mL de cada simulante en bolsas de PLA/zeína de 80 cm^2 . La evaluación de la concentración de LAE liberado a 24, 48 y 72 h, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando como fase móvil acetonitrilo (solvente A) y agua Milli-Q (solvente B) con 0,1 % de ácido trifluoroacético con una velocidad de flujo de 1 mL/min., y realizando un gradiente de concentraciones de A:B 50:50 durante 7 minutos, A:B 100:0 en los siguientes 6 minutos y finalizando con A:B 50:50 durante dos minutos. La detección se llevó a cabo con un detector UV a una longitud de onda de 205 nm.

La cantidad liberada se calculó respecto a los valores obtenidos con una curva patrón de concentraciones conocidas de LAE. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Cuantificación de la capacidad antioxidante.

La caracterización de la actividad antioxidante de las películas se realizó mediante el método de secuestro de radicales libres DPPH.

El DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) es un radical estable coloreado que presenta su máximo de absorción a 517 nm. El método de DPPH se basa en la reducción de esta absorbancia por la acción antioxidante del compuesto.

Para su medida, se sumergieron 3 cm^2 de cada tipo de película -zeína con 5 y 10% de LAE y un 5% de catequina- en viales de vidrio con 5 mL del simulante alimentario (ácido acético al 3% o etanol al 10%) o de zumo de naranja natural. Las películas se conservaron en refrigeración a 4°C y se retiraron a diferentes tiempos (24, 48 y 168 h).

Se preparó una disolución etanólica de 2 mM del radical DPPH·, consistente en 0.0079 g de DPPH· disueltos en 20 ml de etanol en agitación durante 1 h.

A continuación se añadieron 500 μL de la misma a 5 mL de cada muestra y otros 5 mL a una muestra control sin película. Se almacenó durante 15 minutos en la oscuridad y se procedió a la lectura de la absorbancia a 517 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro UV-Vis.

La actividad antioxidante se midió como la reducción de la absorbancia máxima A_{MAX} (muestra sin antioxidante), según la ecuación (1):

$$\%Inhibición = \frac{A_{MAX} - A}{A_{MAX}} \cdot 100 \quad (1)$$

dónde: A_{MAX} =absorbancia máxima; A =absorbancia; %inhibición=capacidad antioxidante.

Para convertir los datos de capacidad antioxidante de las muestras problema en valores comparables, los datos se tradujeron en cantidades equivalentes de trolox calculados respecto a los valores obtenidos con una curva patrón de disoluciones conocidas de trolox. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Preparación de medios de cultivo microbiológicos

Todos los medios de cultivo empleados en el presente trabajo se adquirieron en forma deshidratada. Su preparación se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se pesa la cantidad correspondiente del medio de cultivo deshidratado se adiciona un litro de agua desionizada y tras agitación, se esteriliza durante 15 minutos a 121°C en un autoclave. Los medios de agar se dejaron enfriar hasta unos 50°C y se vertieron sobre placas Petri de 90mm en una cámara de flujo laminar. Se dejaron enfriar hasta que gelificaron y se conservaron en cámara de refrigeración a 4°C hasta su utilización. Los medios líquidos se hicieron de la misma manera preparando diferentes alícuotas previamente al proceso de autoclavado.

Recuperación de las cepas bacterianas

Se partió de un criovial que contenía un glicerinado de la bacteria conservado a -80°C. A partir de éste, una vez descongelado, se tomó una cantidad suficiente con el asa de Henle y se preparó un minicultivo del microorganismo en 10 mL de caldo triptona y soja (TSB). Una vez sembrado, se dejó incubar en estufa a 37°C durante 24 h. A partir del minicultivo se sembró una placa mediante triple estría y, de nuevo, se dejó incubar en estufa a 37°C durante 24 h más, consiguiendo el aislamiento de una colonia.

Tras ese periodo se tomó una colonia aislada con el asa de Henle y se inoculó en zig-zag sobre una superficie de agar inclinado, incubándose en estufa a 37°C durante 24 h, después de este tiempo, se almacenó en cámara de refrigeración a 4°C para la conservación de los microorganismos. Todos los experimentos se llevaron a cabo partiendo de un minicultivo en TSB del agar inclinado.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las observaciones con SEM de *L. innocua* y de *S. enterica* se llevaron a cabo para determinar el mecanismo de acción de LAE. Para ello se preparó un minicultivo, inoculando una pequeña muestra extraída con el asa de Henle del tubo de agar inclinado en un tubo con 10 mL de TSB y se incubó durante 18 h a 37 °C. Se tomaron 100 µL de dicho minicultivo, se inocularon en 10 mL de TSB previamente atemperado, y se introdujeron en el baño a 37°C en agitación para llevar al microorganismo a fase exponencial de crecimiento, lo que equivale a una absorbancia de 0,2 a 595nm (aproximadamente 10^5 UFC/mL). Finalmente, se inocularon 100 µL de microorganismo en fase exponencial en los tubos previamente preparados

con 10 mL de TSB a los cuales se le añadieron concentraciones conocidas de LAE, 0, 12 y 16 ppm respectivamente. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h.

Tras el tratamiento, las muestras se lavaron dos veces para eliminar los restos del medio de cultivo, para ello se centrifugaron y se resuspendieron en una disolución salina (NaCl 0,8%). La suspensión se filtró en una membrana Nucleopore Track-Etch 0,2 mm (Whatman, Reino Unido). Por último, las membranas se deshidrataron en alcoholes crecientes en pureza (30, 50, 70, 90 y 100%). Las bacterias fueron observadas a un voltaje de trabajo entre 5 y 10 kV.

Estudio de la capacidad antimicrobiana de las películas de zeína con LAE y catequina frente a *L. innocua* y *S. enterica*.

La actividad antimicrobiana de las películas desarrolladas se estudió en medio líquido frente a *L. innocua* y *S. enterica*.

Se inocularon 100 µL de microorganismo en fase exponencial en los tubos previamente preparados con 10 mL de MHB, a los cuales se les añadieron 3 cm² (0,02 g) de cada una de las películas desarrolladas. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h. En función de la turbidez de los tubos, se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona. Un volumen de 100 µL de cada dilución se sembró en placas Petri de aproximadamente 15 mL de medio de cultivo MHA. Se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Como control se utilizaron películas de zeína con glicerol u ácido oleico sin agente antimicrobiano ni antioxidante.

Aplicación y estudio de la capacidad antimicrobiana de las películas de PLA/zeína con LAE y catequina en el envasado de un zumo de naranja natural y de una bebida de soja comercial

REDUCCIÓN DE LA CARGA MICROBIANA DE UN ZUMO DE NARANJA NATURAL.

Se realizó un estudio de la capacidad antimicrobiana de las bolsas preparadas con PLA/zeína con glicerol, 10% de LAE y 5% de catequina sobre la carga microbiana de un zumo de naranja recién exprimido. Para ello se tomaron alicuotas de 10 mL de zumo de naranja en condiciones estériles en bolsas de 80 cm², se cerró la parte superior con una termoselladora y se almacenaron a 4°C en nevera simulando las condiciones de refrigeración. El estudio microbiológico se llevó a cabo a día 1 y 3 de almacenamiento. Para efectuar el análisis, se sembraron diluciones seriadas en agua de peptona de las muestras en medios selectivos con las correspondientes condiciones de incubación: a) agar nutriente para aerobios mesófilos (PCA), incubados a 30°C durante 1 día, b) agar nutriente para aerobios psicrófilos (PCA), incubados a 10°C durante 10 días, c) agar bilis glucosa rojo violeta para

enterobacterias (VRBGA), incubadas a 37°C durante un día, d) agar de MRS para lácticas (MRS), incubadas a 25°C durante 4 días, e) agar de patata dextrosada para hongos (PDA), incubados a 28°C durante 6 días.

Tras el tiempo de incubación de cada uno de los medios se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Este experimento se llevó a cabo por triplicado y se utilizaron como control bolsas sin compuestos antimicrobianos ni antioxidantes.

ZUMO DE NARANJA INOCULADO CON *L. innocua*.

El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el epígrafe anterior, pero previamente al sellado de las bolsas se inocularon 100 µL de *L. innocua* en fase exponencial. Las bolsas fueron almacenadas a 4°C en nevera. El estudio microbiológico se llevó a cabo a día 1 y 3 sembrando en medio selectivo Palcam agar. Tras el tiempo de incubación a 37°C durante 24h, se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los experimentos se realizaron por triplicado, y se utilizaron como control bolsas sin compuestos antimicrobianos ni antioxidantes.

BEBIDA DE SOJA INOCULADA CON *L. innocua* Y *S. enterica*.

Se estudió la capacidad antimicrobiana de las bolsas desarrolladas en una bebida de soja UHT adquirida en un centro comercial e inoculada con microorganismos patógenos de relevancia en toxiinfecciones alimentarias. Para ello, en cada una de las bolsas se introdujeron 10 mL de bebida de soja y se inocularon con 100 µl de *L. innocua* o *S. enterica* en fase exponencial, las bolsas se termosellaron y se almacenaron en una cámara a 4°C, simulando las condiciones de refrigeración del alimento durante 1, 3 y 6 días.

Posteriormente se realizaron diferentes diluciones de la bebida de soja en agua de peptona y se sembraron 100 µl de cada una de las diluciones en los medios de cultivo selectivos correspondientes para cada uno de los microorganismos. Las muestras inoculadas con *L. innocua* se sembraron en Palcam agar, y tras 24 h a 37°C se contaron colonias que presentaban un precipitado negro. Las muestras inoculadas con *S. enterica* se sembraron en agar verde brillante y, tras 24 h a 37°C, las colonias que se contaron fueron de color rosáceas sobre fondo rojo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizaron como control bolsas sin compuestos antimicrobianos ni antioxidantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de películas y bolsas de zeína.

Siguiendo los procedimientos descritos en la sección experimental se obtuvieron las películas y bolsas de zeína con un 5 o 10 % LAE y/o un 5 % de catequina.

Las bolsas se desarrollaron con éxito mediante la técnica de *casting*, y presentaron un grosor medio de 37µm, siendo el grosor medio de la capa de zeína sin el PLA de 12µm, no se apreciaron cambios relevantes en el

espesor con la incorporación del agente antimicrobiano ni antioxidante. La FIGURA 1 muestra un ejemplo de una película de zeína y la FIGURA 2 presenta las bolsas confeccionadas con las películas de PLA recubiertas de zeína. Tanto las películas de zeína como las películas de PLA recubiertas de zeína fueron transparentes con un ligero color amarillo-marrón sin diferencias apreciables entre las distintas concentraciones de LAE o catequina añadidas, sin discontinuidades ni defectos observables a simple vista. Tampoco se apreciaron diferencias debidas al plastificante empleado (glicerol o ácido oleico).

Una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas en un desecador con gel de sílice a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.



FIGURA 1. Película de zeína con un 5 % de LAE y catequina.

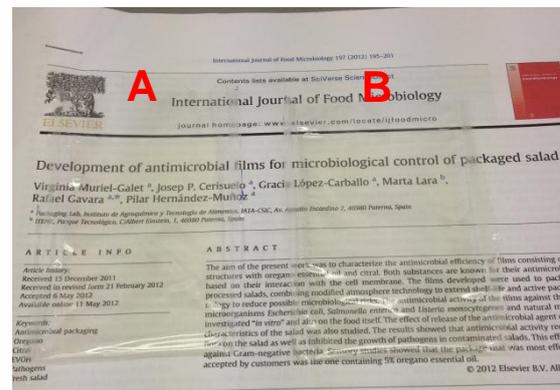


FIGURA 2. Bolsas A: PLA/zeína con un 5% de LAE y catequina; y B: PLA/zeína con un 10 % LAE.

Estudio de liberación de LAE de las películas de PLA/zeína.

Con el objetivo de conocer la cantidad de LAE que se liberaba de las bolsas en función del tiempo, se realizó un ensayo de migración en dos simulantes alimentarios: etanol al 10 %, empleado para alimentos hidrofílicos, y ácido acético al 3 %, para alimentos hidrofílicos con $\text{pH} \leq 4,5$, de acuerdo con la legislación vigente (Reglamento (UE) N° 10/2011). Mediante HPLC se cuantificó la cantidad de LAE liberado tras 24, 48 y 72 h. Los resultados obtenidos mostraron que para todas las muestras y en ambos simulantes, la cantidad de LAE liberado tras 24 h permaneció constante en los ensayos posteriores, lo que es indicativo de una cinética de liberación muy rápida. Lamentablemente, el procedimiento de fabricación de las bolsas y de almacenamiento para este ensayo impidió realizar ensayos a tiempos más cortos por lo que no pudieron obtenerse curvas que permitieran caracterizar la velocidad del proceso. No obstante, resultados obtenidos en el laboratorio de envases con otros polímeros hidrofílicos más estables estructuralmente que la zeína, permiten predecir que el proceso podría haber acabado en la primera hora de ensayo (Muriel-Galet *et al.*, 2014).

La TABLA 1 recoge las concentraciones medias de liberación de LAE de cada película y en los dos simulantes alimentarios ensayados. Como era de esperar, la concentración de LAE liberado fue mayor en las bolsas que

contaban con un 10% de agente antimicrobiano. No se observaron diferencias relevantes entre los plastificantes aunque en las películas con 5% de LAE, la liberación fue superior en las que llevaban glicerol. El empleo de los simulantes no produjo diferencias en la liberación de LAE.

En general, la liberación de un agente suele caracterizarse por un equilibrio de reparto que suele ser función de la compatibilidad del compuesto con los componentes del sistema e independiente de la concentración de partida del agente, salvo que su presencia modifique substancialmente el comportamiento de alguno de ellos. Para conocer este equilibrio, se han obtenido los valores de la constante de reparto K, que viene definida como la relación entre las concentraciones de LAE en la fase polimérica y en la fase de alimento (simulante en este caso). La TABLA 1 también muestra los resultados de este parámetro para las diferentes muestras y tipos de simulantes ensayados.

TABLA 1. Constantes de equilibrio de la concentración de LAE en el polímero frente a la concentración de LAE en el simulante expresada en ppm (p/v) con los diferentes simulantes de migración y con cada tipo de bolsa de PLA/zeína con diferentes plastificantes, LAE 5 y 10% y catequina 5%.

	c ppm (p/v)		K	
	EtOH 10%	Ác. acético 3%	EtOH 10%	Ác. acético 3%
Glicerol LAE 5%	223 ± 36	223 ± 34	99 ± 54	97 ± 46
Glicerol LAE 10%	364 ± 63	333 ± 20	168 ± 60	195 ± 23
Ácido oleico LAE 5%	159 ± 19	225 ± 47	197 ± 37	90 ± 28
Ácido oleico LAE 10%	318 ± 22	309 ± 64	213 ± 30	229 ± 55

Como puede verse en la TABLA 1, salvo para la muestra plastificada con ácido oleico y expuesta a etanol al 10%, sí que se produce un efecto significativo de la concentración en la liberación de LAE. Los valores de K son superiores para las películas con 10% de LAE, lo que indica que a mayor concentración de agente, la liberación es menos eficiente. Este efecto puede deberse o bien a que la liberación de LAE modifica el medio simulante, hipótesis posible dado el carácter surfactante del compuesto, o la modificación en el polímero, más complicado de explicar dado el elevado efecto en la matriz que los plastificantes y el agua producen.

Cuantificación de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de las películas desarrolladas se determinó mediante el método de radicales libres DPPH· en los dos simulantes alimentarios utilizados anteriormente (etanol 10 % y ácido acético 3%) y en un zumo de naranja variedad *navel lane late* recién exprimido.

Los resultados obtenidos con el simulante EtOH 10%, para alimentos hidrofílicos, se muestran en la TABLA 2. Se observó que en las películas que contenían glicerol hubo una liberación gradual de catequina, obteniéndose el máximo a las 168 h; en cambio, con el ácido oleico hubo una liberación más

rápida alcanzándose el máximo a las 48 h. En todos los casos, los máximos de catequina liberada equivalen a 4,5 $\mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$.

TABLA 2. Capacidad antioxidante de las películas de zeína con diferentes plastificantes, LAE 5 y 10% y catequina 5 % en simulante alimentario EtOH 10% expresada en $\mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$ a 24, 48 y 168 h de ensayo.

EtOh 10%	24 h	48 h	168 h
Glicerol LAE 5% cat	3,64 \pm 1,04	3,89 \pm 0,04	4,44 \pm 0,84
Glicerol LAE 10% cat	2,74 \pm 0,41	2,88 \pm 0,06	4,24 \pm 1,35
Ácido oleico LAE 5% cat	4,52 \pm 0,40	4,66 \pm 1,14	3,68 \pm 0,19
Ácido oleico LAE 10% cat	4,18 \pm 0,42	4,91 \pm 0,60	3,16 \pm 0,38

Los resultados obtenidos con el simulante ácido acético 3%, para alimentos hidrofílicos con $\text{pH} \leq 4,5$, se muestran en la TABLA 3. En medio ácido se observa que con glicerol se produce una liberación más rápida de la catequina, llegando a la máxima liberación a las 24 h. En cambio, con el ácido oleico, se produce una liberación continua, llegando a la liberación máxima a las 168 h. De nuevo, la liberación máxima alcanzada se encuentra cercana a los 4 $\mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$.

TABLA 3. Capacidad antioxidante de las películas de zeína con diferentes plastificantes, LAE 5 y 10% y catequina 5 % en simulante alimentario ácido acético 3% expresada en $\mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$ a 24, 48 y 168 h de ensayo.

Ácido acético	24 h	48 h	168 h
Glicerol LAE 5% cat	4,27 \pm 0,29	1,79 \pm 0,26	2,39 \pm 0,68
Glicerol LAE 10% cat	4,60 \pm 0,72	2,14 \pm 0,17	2,62 \pm 0,05
Ácido oleico LAE 5% cat	2,37 \pm 0,15	3,92 \pm 0,79	3,39 \pm 0,64
Ácido oleico LAE 10% cat	2,40 \pm 0,37	3,87 \pm 1,29	3,97 \pm 0,57

Pese a las pequeñas diferencias de la capacidad antioxidante entre las muestras, se puede establecer que la capacidad antioxidante no varía con respecto al tipo de película ni al simulante, y que las pequeñas diferencias pueden ser debidas al método y a la variabilidad de las películas. Para conocer qué porcentaje de catequina se estaba liberando, se realizaron ensayos independientes de la capacidad antioxidante de la catequina en ambos simulantes. Los resultados obtenidos, indicaron que las películas desarrolladas deberían tener una capacidad antioxidante máxima de 4,3 $\mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$. Este dato permite concluir que la cantidad liberada por las películas desarrolladas se corresponde con la totalidad de la catequina adicionada inicialmente al polímero.

Se realizó un ensayo independiente exponiendo las películas a zumo de naranja y determinando la capacidad antioxidante a las 24 horas. Antes de la exposición, el zumo tuvo una capacidad antioxidante de 12,5 $\mu\text{g trolox}/\text{mL}$; tras la exposición, se midió una capacidad antioxidante de 15,5 $\mu\text{g trolox}/\text{mL}$,

lo que corresponde a una liberación de catequina de $4,8 \pm 1,5 \mu\text{g trolox}/\text{cm}^2$, similar a la observada en ambos simulantes.

Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se define como la mínima concentración de compuesto activo a la que se observa inhibición en el crecimiento de un microorganismo, y la concentración mínima bactericida (CMB) como aquella en la cual no hay crecimiento alguno del microorganismo (Smith-Palmer *et al.*, 1998).

Estudios previos realizados en el laboratorio determinaron que la CMI de LAE frente a *L. innocua* y frente a *S. enterica* eran 7 y 12 ppm y la CMB 12 y 16 ppm, respectivamente (Muriel-Galet *et al.*, 2012).

Con el fin de comprobar si hay cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con LAE, se observaron mediante SEM muestras control (FIGURA 3 y FIGURA 5) frente a bacterias expuestas durante 24 h a 37°C a las CMB establecidas (FIGURA 4 y FIGURA 6). Como se observa en las figuras, las bacterias tratadas muestran alteraciones morfológicas en comparación con las muestras control.

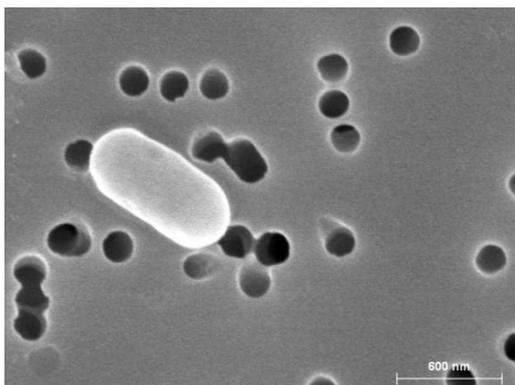


FIGURA 3. *L. innocua* control.

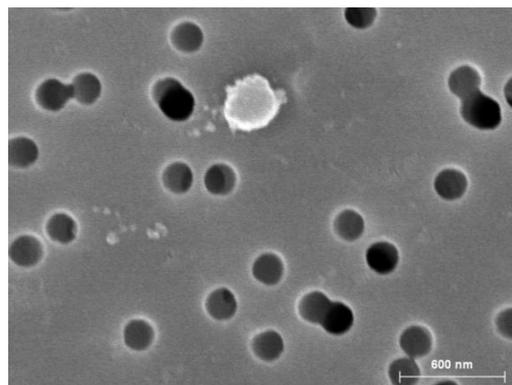


FIGURA 4. *L. innocua* tratada con LAE.

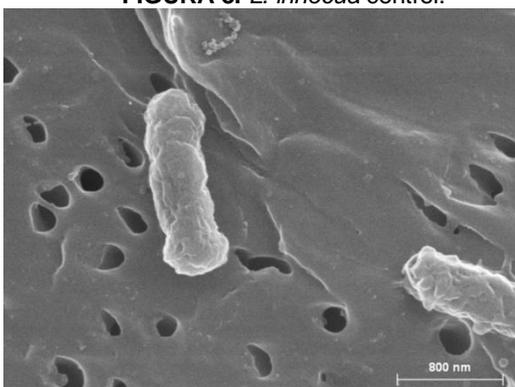


FIGURA 5. *S. enterica* control.

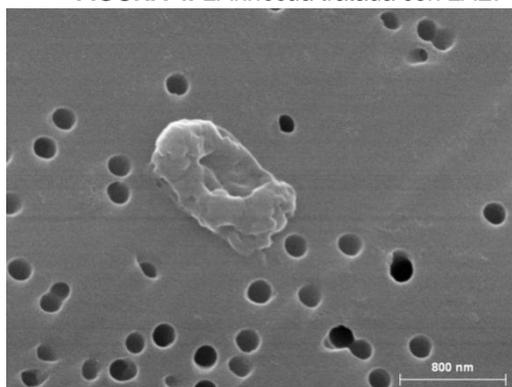


FIGURA 6. *S. enterica* tratada con LAE.

Se ha demostrado que LAE produce cambios en la envoltura celular, lo que indica que las membranas son el principal objetivo de LAE, en concordancia con trabajos que reflejan que la disrupción en la membrana

provoca un incremento en el flujo de iones (Rodríguez *et al.*, 2004). En general los surfactantes catiónicos tienen actividad antimicrobiana ya que alteran la pared celular y las membranas produciendo la despolarización de la membrana citoplasmática y la pérdida de compuestos intracelulares. Sin embargo, LAE produce alteraciones sin llegar a la pérdida de la integridad celular (Rodríguez *et al.*, 2004).

En la FIGURA 4 se puede observar que tras el tratamiento, la bacteria perdió su morfología. Frente a Gram positivas el daño es mayor al carecer de membrana externa protectora, la pared celular se vuelve más fina, se forman poros y estructuras intracelulares tipo mesosomas que dañan seriamente el funcionamiento de la célula (Rodríguez *et al.*, 2004).

En la FIGURA 6 se puede observar que, tras el tratamiento, la bacteria perdió la estructura compacta de la membrana externa. Estudios llevados a cabo por otros autores han demostrado que el LAE actúa frente a bacterias Gram negativas como *S. typhimurium* alterando la compacta estructura de su membrana externa pero sin que pierda la integridad celular.

Estudio de la capacidad antimicrobiana de las películas de zeína con LAE y catequina frente a *L. innocua* y *S. enterica*.

Inicialmente se estudió el efecto antimicrobiano de las películas desarrolladas frente a dos microorganismos: un modelo de bacteria Gram positiva: *L. innocua*, -cepa subrogada de *L. monocytogenes*- y un modelo de bacteria Gram negativa: *S. enterica*. Los resultados se muestran en la TABLA 4.

TABLA 4. Actividad antimicrobiana de las películas de zeína frente a *L. innocua* y *S. enterica* a 37°C expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y el valor de reducción logarítmica.

Película	<i>L. innocua</i>		<i>S. enterica</i>	
	Log	Reducción	Log	Reducción
Control	8,52 ± 0,07	-	8,86 ± 0,04	-
Glicerol	8,63 ± 0,14	-	8,82 ± 0,16	-
Glicerol + LAE 5%	6,05 ± 0,19	-2,47	6,88 ± 0,33	-1,98
Glicerol + LAE 5% + cat 5%	7,11 ± 0,03	-1,42	6,78 ± 0,35	-2,08
Glicerol + cat 5%	8,48 ± 0,03	-	8,92 ± 0,01	-
Glicerol + LAE 10%	2,14 ± 0,26	-6,38	6,55 ± 0,07	-2,31
Glicerol + LAE 10% + cat 5%	4,14 ± 0,33	-4,38	6,35 ± 0,07	-2,51
Oleico	8,20 ± 0,09	-	8,50 ± 0,14	-
Oleico + LAE 5%	8,31 ± 0,02	-	8,51 ± 0,19	-
Oleico + LAE 5% + cat 5%	8,50 ± 0,09	-	8,90 ± 0,14	-
Oleico + cat 5%	8,08 ± 0,06	-0,44	8,91 ± 0,02	-
Oleico + LAE 10%	8,44 ± 0,13	-	9,02 ± 0,14	-
Oleico + LAE 10% + cat 5%	8,39 ± 0,08	-	8,73 ± 0,07	-

Se observó que todas las películas que contenían glicerol como agente plastificante y LAE inhibían el crecimiento de ambos microorganismos. En cambio, las películas con ácido oleico como agente plastificante no presentaron efecto antimicrobiano. Algunos autores han atribuido la falta de actividad del LAE a que el ácido oleico produzca un núcleo no polar de micelas en la matriz polimérica donde queda retenido el LAE impidiendo así su disponibilidad en el medio (Perdones *et al.*, 2014). Sin embargo, los ensayos de liberación indican que el LAE se ha liberado en proporciones similares con ambos plastificantes. Otra hipótesis que da explicación a la falta de efectividad del LAE liberado es que éste potencie la liberación al medio acuoso del ácido oleico, compuesto de poca solubilidad en agua, formando micelas y actuando el LAE como surfactante por lo que el LAE no queda disponible en su totalidad para actuar contra los microorganismos. Para confirmar estas hipótesis, se realizaron dos ensayos, en los cuales se añadieron directamente la cantidad presente en una película de 3 cm², de oleico y LAE, y la de glicerol y LAE que estarían en el medio de cultivo MHB tras la exposición. Mientras la muestra de glicerol produjo una actividad antimicrobiana similar a la obtenida con las películas, en el ensayo con oleico se observó que no había actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados (datos no mostrados).

Se observó que las películas de catequina que llevaban oleico como plastificante inhibieron 0.48 log el crecimiento de *L. innocua*. Aunque las catequinas han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades antioxidantes y por este motivo se han empleado en este trabajo, también existen estudios que corroboran que la cantidad adicionada en las películas inhibe de modo similar el crecimiento de *L. monocytogenes* (Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2011).

LAE es más activo frente a bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas. Estudios previos ya mostraron que las CMI y CMB son superiores para bacterias Gram negativas (Muriel-Galet *et al.*, 2012). Los organismos Gram negativos tienen un sistema de defensa mayor y son menos susceptibles a la acción antibacteriana ya que poseen una membrana externa que rodea la pared celular que restringe la difusión de los compuestos a través de su cubierta de lipopolisacáridos (Vaara, 1992). Esta mayor resistencia de las bacterias Gram negativas se ha estudiado también frente a otros antimicrobianos (Canillac y Mourey, 2001; Delaquis *et al.*, 2002; Harpaz *et al.*, 2003).

Estudio de la capacidad antimicrobiana de bolsas de PLA/zeína con LAE y catequina en:

REDUCCIÓN DE LA CARGA MICROBIANA DEL ZUMO DE NARANJA A 4°C.

Las películas de PLA/zeína con un 10 % de LAE y 5 % catequina se aplicaron en el envasado de zumo de naranjas *navel lane late* recién

exprimido. Las bolsas se almacenaron en refrigeración y se analizó la efectividad frente a la carga microbiana habitual del zumo tras 1 y 3 días de almacenamiento.

Los resultados del ensayo se muestran en la TABLA 5, donde se puede observar que las películas desarrolladas no presentan capacidad antimicrobiana frente al crecimiento de bacterias lácticas, mesófilas ni hongos tanto a día 1 como a día 3. Sin embargo, a día 3 las películas con LAE inhibieron 0.5 log el crecimiento de las bacterias psicrófilas que son aquellas capaces de crecer bien en condiciones de refrigeración.

También se realizó el estudio de reducción de carga microbiana de enterobacterias. Los resultados de este estudio no se han puesto en el presente trabajo debido a que no se encontraron enterobacterias en el zumo de naranja lo que es indicativo de que el zumo se realizó de acuerdo a las buenas prácticas de manipulación de alimentos.

TABLA 5. Actividad antimicrobiana de las películas de PLA/zeína frente a bacterias lácticas, hongos, mesófilos y psicrófilos a 4°C expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y el valor de reducción logarítmica.

LÁCTICAS				
	DÍA 1		DÍA 3	
	log	Reducción	log	Reducción
Control	2,94 ± 0,07		3,19 ± 0,05	
Glicerol LAE 10% cat	3,03 ± 0,03	-	3,05 ± 0,04	-0,14

HONGOS				
	DÍA 1		DÍA 3	
	log	Reducción	log	Reducción
Control	2,88 ± 0,03		3,07 ± 0,04	
Glicerol LAE 10% cat	2,89 ± 0,15	-	2,98± 0,01	-0,08

MESÓFILOS				
	DÍA 1		DÍA 3	
	log	Reducción	log	Reducción
Control	3,09 ± 0,03		3,18 ± 0,01	
Glicerol LAE 10% cat	3,13 ± 0,06	-	3,08± 0,08	-0,10

PSICRÓFILOS				
	DÍA 1		DÍA 3	
	log	Reducción	log	Reducción
Control	2,84 ± 0,17		3,07 ± 0,18	
Glicerol LAE 10% cat	2,43 ± 0,25	-	2,56 ± 0,16	-0,51

ZUMO DE NARANJA INOCULADO CON *L. innocua* A 4 °C.

Del mismo modo que en el epígrafe anterior se estudió la efectividad de las bolsas en el zumo de naranja natural previamente contaminado con *L. innocua*. En la TABLA 6 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA 6. Actividad antimicrobiana de las películas de PLA/zeína en zumo de naranja inoculado con *L. innocua* a 4°C expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y el valor de reducción logarítmica.

	<i>L. innocua</i>			
	DÍA 1		DÍA 3	
	log	Reducción	log	Reducción
Control	5,51 ± 0,37		5,51 ± 0,37	
Glicerol LAE 10% cat	5,82 ± 0,06	-0,30	3,45 ± 0,21	-2,07

A día 1 se observa una reducción de 0,3 log, y a día 3 una reducción de 2,07 log. Estos resultados de inhibición son de menor eficacia que los realizados *in vitro*, donde la reducción del microorganismo fue de 4,44 log. El cambio de condiciones de ensayo *in vitro* a *in vivo* con alimento suele disminuir la efectividad de los agentes antimicrobianos. Los ensayos realizados *in vitro* se llevan a cabo en condiciones óptimas de medios de cultivo y temperaturas de incubación. Cuando se trabaja con un alimento la matriz o propiedades morfológicas, físicas o químicas pueden interferir con el agente antimicrobiano, necesitando concentraciones más elevadas para alcanzar el mismo efecto (Burt, S., 2004; Gutiérrez *et al.*, 2008).

En el caso del zumo de naranja el empleo de un pH tan bajo podría degradar el LAE o modificar su liberación lo que explicaría la menor efectividad de las bolsas.

Los zumos de naranja debido a su bajo pH no suelen presentar una elevada carga microbiana, pero si sufrir una mala manipulación o contaminación cruzada acortando así su vida útil. Además, el empleo de un envase activo podría permitir comercializar zumos naturales o con tratamientos más leves puesto que los que existen en la actualidad presentan un innegable deterioro en sus características organolépticas y producen cierto rechazo por parte de los consumidores.

BEBIDA DE SOJA INOCULADA CON *L. innocua* Y *S. enterica* a 4°C.

Finalmente, las bolsas desarrolladas se aplicaron en el envasado de una bebida de soja comercial UHT inoculada previamente con *L. innocua* y *S. enterica* y se estudió el efecto de la inhibición del envase activo frente a dichos microorganismos a temperatura de refrigeración, 4°C, durante 1, 3 y 6 días.

En la TABLA 7 se muestran los resultados.

TABLA 7. Actividad antimicrobiana de las bolsas de PLA/zeína en bebida de soja inoculada con *L. innocua* y *S. enterica* a 4°C expresada en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y el valor de reducción logarítmica.

<i>L. innocua</i>						
	DÍA 1		DÍA 3		DÍA 6	
	log	Reducción	log	Reducción	log	Reducción
Control	6,46 ± 0,22		7,90 ± 0,23		8,12 ± 0,13	
Glicerol LAE 10% cat	6,05 ± 0,28	-0,41	7,53 ± 0,12	-0,40	7,62 ± 0,27	-0,50

<i>S. enterica</i>						
	DÍA 1		DÍA 3		DÍA 6	
	log	Reducción	log	Reducción	log	Reducción
Control	5,69 ± 0,00		6,24 ± 0,20		5,95 ± 0,30	
Glicerol LAE 10% cat	5,19 ± 0,11	-0,50	5,66 ± 0,20	-0,58	5,29 ± 0,19	-0,66

En las bolsas control de *L. innocua*, ésta creció a lo largo del ensayo debido a que este microorganismo es capaz de crecer a temperatura de refrigeración. Las bolsas con agente antimicrobiano fueron capaces de reducir el crecimiento del microorganismo a lo largo de todo el período de almacenamiento, con unas reducciones de 0,41, 0,40, y 0,50 log frente a los controles a días 1, 3 y 6 respectivamente.

L. monocytogenes puede producir septicemias y meningitis, en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas. Sin embargo también se dan casos de listeriosis en niños y adultos aparentemente sanos. En embarazadas puede provocar abortos o muerte prematura del feto. Por todo ello, es necesario evitar su crecimiento en productos susceptibles de contaminación. *Listeria* es un microorganismo psicrófilo, capaz de crecer a temperaturas comprendidas entre 4 y 45°C, su temperatura mínima de crecimiento está comprendida entre 0,5 y 3°C, por lo que la refrigeración no es suficiente para poder frenar el crecimiento de este microorganismo en los alimentos, además *Listeria* es capaz de sobrevivir a los procesos de pasteurización (Fleming *et al.*, 1985; Lovett *et al.*, 1987).

En las bolsas control de *S. enterica*, el crecimiento del microorganismo se mantuvo constante, sin observarse aumento de crecimiento de colonias - cabe destacar, que la temperatura límite de crecimiento es de 6°C-. En cambio, en las bolsas que contenían agente antimicrobiano se observó una reducción de 0,50, 0,58 y 0,66 log frente a los controles durante los días 1, 3 y 6 respectivamente.

Igual que ocurrió con el zumo de naranja, la acción del agente antimicrobiano no tuvo tanto efecto como en los ensayos realizados *in vitro*. Además de lo mencionado anteriormente, cabe tener en cuenta que las condiciones en las que se han inoculado los alimentos con los microorganismos patógenos han sido extremas (elevada concentración y

fase exponencial del patógeno), por lo que una posible contaminación fuera del laboratorio sería menor.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha optimizado un método para la obtención de películas activas de PLA/zeína con LAE al 5 y 10% y catequina al 5%, usando como agentes plastificantes glicerol o ácido oleico.

Los resultados han mostrado que a mayor concentración de LAE en la película hay una liberación menos eficiente del mismo.

La presencia de catequina ha dotado a las películas de capacidad antioxidante sin que se aprecien diferencias en actividad antioxidante con respecto al plastificante y a la cantidad de LAE añadida en cada caso. Dicha actividad se pone de manifiesto cuando se utiliza en el envasado de zumo de naranja.

El LAE es un agente antimicrobiano y su presencia en las películas que llevan glicerol como plastificante, mostraron una alta efectividad frente a las bacterias modelo estudiadas: *L. innocua* y *S. enterica*, siendo más eficaces frente a bacterias Gram positivas. Las películas con ácido oleico no mostraron actividad a pesar de que el agente se libera en concentraciones similares debido a su actuación como surfactante ante la liberación en el medio acuoso del ácido oleico.

La aplicación de las películas desarrolladas en el envasado de un alimento ácido, zumo de naranja natural recién exprimido, inhibe el crecimiento de *L. innocua* a los tres días de almacenamiento en condiciones de refrigeración, pero no tuvo actividad reseñable frente a la carga microbiana habitual.

La aplicación de las películas desarrolladas en el envasado de una bebida de soja comercial inhibe 0,50 log y 0,66 log el crecimiento de *L. innocua* y *S. entérica* a los seis días de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

De los resultados obtenidos, se concluye que las películas obtenidas con glicerol LAE y catequina en el presente trabajo son válidas para su aplicación en el envasado activo de alimentos perecederos y sensibles a la oxidación, si bien sería necesario adaptar las concentraciones a cada tipo de producto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer ante todo a Rafa, Ramón y Pilar por permitirme trabajar en su laboratorio y acogerme en su equipo como a uno más. A Gracia por su eterna paciencia y todo el tiempo que me ha dedicado en este trabajo. A Vir por hacer tan agradable la estancia estos meses sin olvidar al resto de compañeros de laboratorio. A Rocío por su infinito ánimo y apoyo. Y por último a mi familia porque sin ellos no habría llegado hasta donde he llegado hoy en día.

REFERENCIAS

- Anderson, T. J.; Lamsal, B. P. (2011) Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications. *Cereal Chemistry*. 88(2):159–173
- Barclay, L.R.C., Edwards, C.E. Vinqvist, M.R. (1999). Media effects on antioxidant activities of phenols and catechols. *Journal of the American Chemical Society*. 121 (26), 6226-6231.
- Becerril, R.; Manso, S.; Nerin, C.; Gómez-Lus, R.; (2013). Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control* Food Control 32: 404-408.
- Brut, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94. 223 – 253.
- Canillac, N., Mourey, A., 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18, 261–268.
- Catalá, R. y Gavara, R. (2001). Nuevos envases. De la protección pasiva a la defensa activa de los alimentos envasados. *Arbor CLXVIII* N° 661, pp. 109-127.
- Cuq, B; Gontard, N.; Guilbert, S. 1998. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chem.*, 75(1):1-9.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
- Doyle MP, B.L. 2007. Food microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press. , Washington, D.C.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, 312(7): 404-407.
- Fukuhara, K., Nakanishi, I., Kansui, H., Sugiyama, E., Kimura, M., Shimada, T., Urano, planar catechin analogue. *Journal of the American Chemical Society* 124 (21), 5952-5953.
- Gontard, N.; Guilbert, S. 1994. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Food Packaging and Preservation*. Mathlouthi, ed. 159-181.
- Gordon, M. H., Roedig-Penman, A., (1998). Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 97 (1), 7985.
- Gutiérrez J, Barry-Rya C, Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124: 91-97.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Late scarifer*). *Journal of Food Protection*. 66, 410–417.
- Hernández, P.; Lagarón, J. M.; López, A.; Gavara, R. (2004). Gliadins polymerized with cysteine: Effects on the physical and water barrier properties of derived films. *Biomacromolecules* 2004, 5, 1503-1510.
- Krochta, J. M.; DeMulder, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities.
- Lim, L.-T.; Aurasb, R.; Rubino, M. (2008) Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 33 820–852.
- Lovett, J., Francis, D.W., Hunt, J.M. (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*, 50(3): 188-192.

- Martínez-Florez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Muñoz, M. J., (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*XVII (6), 271-278.
- Muriel-Galet, V; López-Carballo, G; Gavara, R; Hernandez, P. (2012) Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE form EVOH. *International Journal of Food Microbiology*.157.239–244.
- Muriel-Galet, V.; López-Carballo, G.; Hernández_Muñoz, P.; Gavara, R.; (2014) Characterization of ethylene-vinyl alcohol copolymer containing laurel arginate (LAE) as material for active antimicrobial food packaging. *Food packaging and shelf life* 1 10-18.
- Pedrielli, P., Pedulli, G. F., Skibsted, L. H., (2001). Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*49 (6), 3034-3040.
- Perdones, A.; Vargas, M.; Atarés, L.; Chiralt, A.; (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids* 36. 256-264
- Rodríguez, E.; Seguer, J.; Rocabayera, X.; Manresa, A.; (2004). Cellular effects of monohydrochloride of l-arginine, Nalpha-lauroylethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of applied microbiology* [1364-5072]. vol.: 96 núm.:5 pág.:903 -912.
- Rodríguez, J., (2009). *Listeria monocytogenes*-el patógeno alimentario del futuro inmediato. Eroski consumer.
- Sanghoon Kim (2010). Production of Biopolymer Composites by Particle Bonding, *Biopolymers*, Magdy Elnashar (Ed.), ISBN: 978-953-307-109-1.
- Shukla, R. y Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13:171–192.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118-122.
- Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 395–411.