

Artículo Original

Propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de películas de quitosano y películas de alginato de sodio con aceites esenciales y nisina

Mechanical, barrier and antimicrobial properties of chitosan films and alginate sodium films with essential oils and nisin

Rosales-Oballos Yolima^{1,2}, Raybaudi-Massilia Rosa^{2*}, Mosqueda-Melgar Jonathan²,
Tapia de Daza María S²., Tomé-Boschian, Elisabetta².

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Sección de Biotecnología y Control Microbiano, Universidad Central de Venezuela, Caracas. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido octubre 2012 - Aceptado febrero 2013

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades mecánicas (solubilidad, extensibilidad y ruptura), de barreras (permeabilidad al vapor de agua (PVA), oxígeno y dióxido de carbono) y antimicrobianas (contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis) de las películas comestibles de alginato de sodio (2% p/v) y de quitosano (de la cubierta quitinosa de camarones) (2% p/v) conteniendo nisina (0, 1000 y 2000 UI/mL), aceites esenciales de ajo (AEA) y de orégano (AEO) (0, 0,25 y 0,5% v/v). Un total de 27 formulaciones fueron elaboradas a partir de un diseño factorial de múltiples niveles. Se determinó cual fue la formulación que presentó las mejores propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobiana, en conjunto, para cada una de las películas evaluadas. Los resultados revelaron que 1000 UI/mL de nisina, 0,25% de AEA y 0,25% de AEO fueron las formulaciones óptimas para ambas películas. Las películas de alginato de sodio presentaron las mejores propiedades evaluadas. La incorporación de antimicrobianos en películas de alginato de sodio influyó sobre las propiedades de las películas, obteniéndose menores valores de PVA ($2,06 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa), fuerza de ruptura (17,66 N) y solubilidad (27,72%) con respecto a las películas control. La incorporación de aceites esenciales y nisina incrementó la efectividad antimicrobiana en las películas de alginato de sodio. En conclusión las

películas comestibles a base de alginato de sodio con la adición de nisina, AEA y AEO representan una alternativa para proteger y garantizar la calidad e inocuidad microbiológica y fisicoquímica de los alimentos.

PALABRAS CLAVE

Películas comestibles, alginato, quitosano, antimicrobianos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mechanical (solubility, extensibility and rupture), barrier (water vapor permeability (WVP), oxygen and carbon dioxide) and antimicrobial (against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis) properties of edible films based on sodium alginate (2% w/v) and Chitosan (of shrimp chitinous cover) (2% w/v) containing nisin (0, 1000, 2000 IU/mL), garlic essential oil (GEO) and Spanish oregano essential oil (OEO) (0, 0.25, and 0.5% v/v). A total of 27 formulations were prepared from a multi-level factorial design. Formulations that presented the best mechanical, barrier and antimicrobial properties were determined for each one of the evaluated films. The results revealed that 1000 IU/mL nisin, 0.25% GEO and 0.25% OEO were the optimal formulations for both films. The sodium alginate films showed

*Correspondencia al autor: rosa.raybaudi@ciens.ucv.ve

the best evaluated properties. The incorporation of antimicrobials in sodium alginate films influenced the properties of it, resulting in lower values of WVP (2.06×10^{-10} g/m.s.Pa), strength (17.66 N) and solubility (27.72%) with respect to the control. The incorporation of essential oils and nisin increased the antimicrobial effectiveness of sodium alginate films. In conclusion, edible films based on sodium alginate with the addition of nisin, GEO and OEO represent an alternative to protect and ensure the microbiological quality safety and physicochemical properties of food.

KEY WORDS

Edible film, alginate, chitosan, antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha investigado sobre diversas posibilidades que existen para empaquetar y conservar los alimentos, entre las cuales se encuentra el uso de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables [1]. Las películas comestibles pueden ayudar significativamente a reducir el impacto negativo que pueden causar los empaques o recubrimientos plásticos al ambiente, ya que en muchos casos estas películas biodegradables son elaboradas a partir de materiales naturales biodegradables, tales como: alginato y quitosano.

El quitosano (poli β -(1, 4)-N-Acetil-D-Glucosamina), una forma diacetilada de la quitina, es un polisacárido catiónico natural que pueden derivarse, entre varias fuentes, de la cubierta quitinosa de los camarones [2]. El quitosano puede inhibir el crecimiento de una amplia variedad de hongos, levaduras y bacterias. El carácter antimicrobiano del quitosano es debido a su grupo amino cargado positivamente, el cual interactúa con la membrana de la célula microbiana cargada negativamente, conduciendo a la salida de los componentes intracelulares, y por ende, a la inactivación del microorganismo [3].

El alginato es un polisacárido, que se obtiene de varios tipos de algas, por ejemplo de las algas pardas de la clase *Phaeophyceae*. Estos son sales de ácido alginico, un copolímero lineal de monómeros de los ácidos β -D-Manurónico y ácido α -L-Gulurónico unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) [4]. Aunque este polisacárido no tiene propiedades antimicrobianas por sí sola, como en el caso de quitosano, este ha demostrado ser un buen transportador de sustancias antimicrobianas y antioxidantes, entre otras [5].

Agentes antimicrobianos tales como nisina (bacteriocina) y aceites esenciales de orégano y ajo han

sido probados con gran eficacia sobre un gran número de microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus* spp., mohos y *Staphylococcus aureus* entre otros [3,5,6,7,8,9,10,11,12,13].

La nisina es un péptido antimicrobiano pequeño, termoestable de 34 aminoácidos producido por *Lactococcus subsp. lactis* [14], que ha sido descrito como una bacteriocina de Clase 1, un grupo que comprende lantibióticos, los cuales son una familia de péptidos activos de membrana que contiene los aminoácidos tioéter inusuales "lantionina" y " β -metil-lantionina, así como otros aminoácidos modificados como la serina deshidratada y treonina [5]. El sitio primario de acción antimicrobiana para la nisina es la membrana citoplasmática, en el cual se produce un cambio conformacional de la misma, y en consecuencia la formación de un poro, por el cual disminuye la fuerza protón-motriz y existe la salida del contenido intracelular (iones, aminoácidos y ATP) [14].

Mientras que los aceites esenciales, también llamados aceites etéreos o volátiles, son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos de materiales vegetales tales como: flores, brotes, semillas, hojas, corteza de ramas, hierbas, madera, frutas y raíces, que pueden obtenerse por fermentación, extracción o destilación [12]. Los aceites esenciales están constituidos de una mezcla compleja de compuestos como terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos y ésteres. Son sustancia GRAS (generally recognized as safe – generalmente reconocida como seguras) y su uso en alimentos como preservativo es con frecuencia limitado debido a consideraciones de sabor-olor [15]. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales contra una amplia variedad de bacterias, levaduras y mohos ha sido demostrada, y su mecanismo de acción está dirigido a múltiples sitios específicos sobre la célula microbiana, entre ellas, degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática y proteínas de membrana, salida del contenido intracelular, coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza protón-motriz [5].

Las películas comestibles a base de polisacáridos entre otras fuentes pueden servir de vehículo de compuestos antioxidantes y antimicrobianos, las cuales pueden actuar sobre los radicales libres y microorganismos alterantes y/o patógenos, mejorando así la vida útil, calidad e inocuidad de los alimentos [13,16,17].

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar las propiedades antimicrobianas (contra *S.*

aureus, *L. monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis) de películas comestibles a base de alginato de sodio y películas a base de quitosano con nisina, y/o aceites esenciales de ajo y/o orégano incorporados solos o en combinación dentro de la formulación de la película, de acuerdo al diseño factorial de múltiples niveles. Además, una caracterización de las propiedades mecánicas (extensibilidad, ruptura y solubilidad) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono) fue también evaluada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Alginato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fueron utilizados como material base para elaborar las películas. Glicerol de grado comestible (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) fue empleado como agente plastificante, y aceite de maíz (Alimentos Polar, Caracas, Venezuela) como agente emulsificante. Adicionalmente, cloruro de calcio (CaCl_2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fue empleado para lograr un mejor entrecruzamiento con las moléculas de alginato de sodio, dándole un carácter de insolubilidad a las películas. Sustancias antimicrobianas tales como: nisina proveniente del *Lactococcus lactis* "lactis" (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), aceite esencial de ajo (AEA) (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) y aceite esencial de orégano (AEO) (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) fueron también incorporadas para impartirle propiedades antimicrobianas a las películas.

Elaboración de las películas:

Solución formadora de películas a base de alginato de sodio (PAS): La solución base fue elaborada con 2% (p/v) de alginato de sodio disuelto en agua destilada previamente calentada a 70°C, luego fue mezclado con 1% (v/v) de glicerol y 0,2% (v/v) de aceite de maíz, a través de un ultra-turrax T25 (IKA®WERKE, Alemania) a 6500 rpm durante 5 min y desgasificada bajo vacío para evitar la formación de burbujas [18,19]. La concentración de 2% (p/v) de PAS fue seleccionada a partir de pruebas preliminares (datos no mostrados).

Solución formadora de películas a base de quitosano (PQ): La solución base fue elaborada con 2% (p/v) de quitosano disuelto primero en una solución de 1% (v/v) ácido acético y luego se le agregó 1% (v/v) de glicerol y 0,2% (v/v) de aceite de maíz [13,18]. La mezcla fue calentada a 70°C en un baño de María durante 15 minutos y homogeneizada con un Ultra

Turrax T25 (IKA®WERKE, Alemania) a 6500 rpm durante 5 min y desgasificada bajo vacío para evitar la formación de burbuja. La concentración de 2% (p/v) de PQ fue seleccionada a partir de pruebas preliminares (datos no mostrados).

Preparación y adición de las sustancias antimicrobianas a las películas:

Preparación de la solución de nisina: Se preparó una solución stock de nisina a una concentración de 10000 UI/mL disolviendo 1 g de nisina comercial al 2,5% en 100 mL de HCl 0,02 N. La solución obtenida se ajustó a pH 4,9 con NaOH 1 N, y se esterilizó a 121°C por 15 min [20,21,22,23]. La solución madre de nisina fue refrigerada a 4°C durante 24 horas antes de su uso. A partir de esta solución stock se prepararon las soluciones de trabajo de 1000 y 2000 UI/mL

Adición de las sustancias antimicrobianas a la solución formadora de película: Nisina (0, 1000 ó 2000 UI/mL), AEO (0, 0,25 ó 0,5%, v/v) y AEA (0, 0,25 ó 0,5%, v/v) se incorporaron como agentes antimicrobianos, solos o en combinación, a las soluciones formadoras de películas, como se especifica en la Tabla 1 (basado en un diseño factorial de múltiples niveles), y fueron mezclado con un Ultra Turrax T25 (IKA®WERKE, Alemania) a 6500 rpm durante 2 min y luego desgasificada bajo vacío.

Formación de las películas: Se adicionaron 20 mL de las soluciones formadoras de películas de quitosano o alginato de sodio con o sin antimicrobianos añadidos a placas de Petri estériles de poliestireno (plásticas) de 8 cm de diámetro, y luego fueron secadas a 50°C en una estufa durante 8 horas. Las PQ fueron removidas de las placas de Petri, y fueron almacenadas a 25°C y 50 ± 10% de HR. Mientras que, las PAS fueron luego sumergidas en una solución de CaCl_2 al 3% (p/v) por 2 min, para favorecer el entrecruzamiento y disminuir su solubilidad en agua [24]. Luego la solución remanente fue descartada y PAS tratadas fueron removidas de las placas de Petri y secadas a temperatura ambiente (25°C) a 50 ± 10% de HR hasta el momento de su evaluación.

Evaluación de las propiedades de las películas:

Determinación de la permeabilidad al vapor de agua: La permeabilidad al vapor de agua se determinó gravimétricamente a 25°C utilizando una modificación del método E96-93 de la ASTM [25]. Se cortaron tres discos de 3 cm de diámetro de cada película, se colocaron sobre cápsulas de metilmetacrilato que contenían 5 mL de agua destilada en su interior, y se

se fijaron con un aro de metilmetacrilato. Las cápsulas se colocaron en desecadores que tenían una solución saturada de cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) a $25^\circ C$ y 33% de HR. El peso de las cápsulas fue registrado cada 30 minutos durante 6 horas.

La transferencia de vapor de agua de las películas (m_t , pendiente de la curva de la pérdida de peso en el tiempo g/s) se calculó por regresión lineal, mientras que la tasa de transferencia de vapor de agua (TPVA) de las películas se determinó dividiendo m_t , entre el área de la película en estudio.

$$TPVA = \frac{m_t}{A} \left(\frac{g}{m^2 \cdot s} \right)$$

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{L \times TPVA}{p_i - p_a} \left(\frac{g}{m \cdot s \cdot Pa} \right)$$

Siendo “L” el promedio del grosor de las películas en metros, “ p_a ” la presión externa de la capsula la cual es igual a 1046 Pa, y “ p_i ” la presión interna de la cápsula la cual es igual a 3170 Pa [12].

Determinación de la permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono: Se empleó el método basado en la norma ASTM D1434-82 [26], el cual determina las propiedades de permeabilidad de gases de materiales poliméricos, utilizando un método volumétrico con una celda de permeabilidad. Las muestras fueron cortadas y medidas bajo condiciones ambientales específicas de laboratorio ($23 \pm 2^\circ C$ de temperatura y $50 \pm 10\%$ de HR).

Determinación de la Solubilidad en agua a temperatura ambiente: Se cortaron 6 rectángulos de 2 cm x 3 cm. Cuatro de las muestras fueron pesadas y puestas en vasos precipitados de 100 mL con 30 mL de agua destilada, sellados con parafilm y dejados por 24 horas a temperatura ambiente. Las piezas remanentes fueron filtradas usando papel de filtro (Whatman N° 1), y llevadas a la estufa ($60^\circ C$) hasta que alcanzaron peso constante. Las otras dos muestras fueron también secadas hasta peso constante, y utilizadas para comparación [27].

El porcentaje de solubilidad fue determinado utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso materia seca inicial} - \text{Peso de materia seca final}}{\text{Peso materia seca inicial}} \times 100$$

Determinación de la extensibilidad y ruptura: El porcentaje de extensibilidad y ruptura de las películas fue evaluado con los métodos estándar de la ASTM D882 [28] para la tensión, con un texturómetro Stable Micro System, modelo TA-XT2i (Haslemere, Surrey, UK). Las películas se cortaron en tiras de 10 cm de largo x 2 cm de ancho y se fijaron con ganchos de tensión al texturómetro. Se aplicó una fuerza de 15 N para evaluar su capacidad extensible o resistencia a la deformación, y una velocidad transversal de 5 mm/s para la tensión. El área expuesta de la película fue de 7 cm de largo. Se evaluó la fuerza de tensión y elongación al punto de fractura y la elasticidad.

Microscopia electrónica de barrido (MEB): Las muestras se recubrieron con oro para conferirles propiedades conductivas y luego fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM 6400F, Tokio, Japón).

Propiedades antimicrobianas de las películas: Se aplicó la técnica de difusión por discos [29,30]. Se cortaron pequeños discos de 0,9-1 cm de diámetro de las distintas películas formuladas y se colocaron sobre placas de agar Muller Hinton (Himedia, Mumbai, India), inoculadas previamente con cultivos puros de *S. aureus*, *L. monocytogenes* o *Salmonella* Enteritidis en una concentración de 10^7 UFC/mL. Posteriormente se incubaron a $37^\circ C$ durante 24-48 horas, y finalmente los halos de inhibición (mm) fueron medidos con un vernier (Mitutoyo Co, Tokio, Japón).

Diseño experimental y análisis estadístico: Se aplicó un diseño “Factorial Multi-nivel”, utilizando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1 (StatPoint Technologies, Inc., Virginia, USA) para obtener películas con las mejores propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas (combinación óptima). Se probaron combinaciones de tratamientos con 3 niveles de nisina, 3 niveles de aceite esencial de ajo, 3 niveles de aceite esencial de orégano, y 2 repeticiones ($3 \times 3 \times 3 \times 2$) contra cada microorganismo evaluado (*Salmonella* Enteritidis, *L. monocytogenes* y *S. aureus*). Un análisis de varianza de múltiples factores con una prueba a posteriori (Test de rango múltiples a través del método de Diferencia Mínima Significativa de Fisher (LSD)) con un nivel de confianza del 95,0% fue llevado cabo, para encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre condiciones de tratamiento (antimicrobianos solos o combinados a diferentes concentraciones) por cada parámetro evaluado (permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y dióxido de carbono, solubilidad, extensibilidad, ruptura y zona de inhibición).

antimicrobiana). Todos los parámetros evaluados se determinaron en dos oportunidades y por duplicado (n=4 ± desviación estándar).

RESULTADOS

Selección de la combinación óptima para cada tipo de película: a partir de los resultados arrojados por el diseño factorial de múltiples niveles, se obtuvieron las PAS y PQ con las mejores propiedades de barrera, mecánicas y antimicrobianas (condición óptima). Estos resultados indicaron como condición óptima, la combinación que incluía una concentración de 1000 UI/mL de nisina, 0,25% de AEA y 0,25% de AEO. Las películas con la condición óptima mostraron las mejores propiedades en cuanto a permeabilidad al vapor de agua, solubilidad y actividad antimicrobiana, pero menos resistencia a la fuerza de ruptura y extensibilidad, en comparación con las películas control o aquellas condiciones en donde un solo antimicrobiano a diferentes concentraciones fue aplicado. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las propiedades mecánicas y de barrera y en la Tabla 3 se muestran las propiedades antimicrobianas de las PAS y PQ para la condición control, combinación óptima, y combinación de las concentraciones máximas de los antimicrobianos evaluados. Adicionalmente, las propiedades de las películas con cada uno de los agentes antimicrobianos evaluados individualmente a diferentes concentraciones fueron también mostradas.

TABLA 1

Formulación de la solución formadora de películas de alginato de sodio al 2% (p/v) y películas de quitosano al 2% (p/v) con o sin agentes antimicrobianos, basado en un diseño factorial de múltiples niveles

Formulación	Condición	Concentración de las sustancias antimicrobianas usadas		
		Ni (UI/mL)	AEA (%)	AEO (%)
F1	Control	0	0	0
F2	Óptima*	1000	0,25	0,25
F3	Máxima	2000	0,50	0,50
F4	Nisina 1	0	-	-
F5	Nisina 2	1000	-	-
F6	Nisina 3	2000	-	-
F7	AEA 1	-	0	-
F8	AEA 2	-	0,25	-
F9	AEA 3	-	0,50	-
F10	AEO 1	-	-	0
F11	AEO 2	-	-	0,25
F12	AEO 3	-	-	0,50

Ni: Nisina; AEA: Aceite esencial de ajo; AEO: Aceite esencial de orégano

*Condición obtenida por el diseño factorial de múltiples niveles.

TABLA 2

Propiedades de barrera, mecánicas y solubilidad de películas comestibles elaboradas a base de alginato de sodio al 2% (p/v) y quitosano al 2% (p/v) con nisina, aceites esenciales de ajo y/o orégano.

Película base	Formulación	Parámetros					
		PVA (x10 ⁻³ g/m.s.Pa)	S (%)	R (N)	E (mm)	PO ₂ (cm ³ /s.cm ²)	PCO ₂ (cm ³ /s.cm ²)
PAS	F1	3,9±0,0 ^a	36,5±0,7 ^a	23,5±0,1 ^a	-16,5±0,2 ^a	1,7±0,3 ^a	29,3±0,5 ^a
	F2	2,1±0,0 ^a	27,7±1,4 ^b	17,7±0,7 ^b	-3,7±0,3 ^b	>30 ^b	>30 ^b
	F3	1,4±0,1 ^a	16,9±1,2 ^b	13,1±0,9 ^b	-11,8±0,2 ^b	-	-
	F4	3,9±0,0 ^a	36,5±0,7 ^a	23,5±0,1 ^a	-16,5±0,0 ^a	-	-
	F5	3,8±0,2 ^a	37,0±0,2 ^a	14,9±0,3 ^b	-14,2±1,4 ^b	-	-
	F6	3,3±0,1 ^a	36,4±0,4 ^a	21,9±1,0 ^a	-3,2±0,5 ^b	-	-
	F7	3,9±0,0 ^a	36,5±0,7 ^a	23,5±0,1 ^a	-16,5±0,0 ^a	-	-
	F8	2,9±0,1 ^a	36,9±0,5 ^a	19,3±1,0 ^a	-13,0±0,0 ^a	-	-
	F9	2,8±0,2 ^a	34,9±1,8 ^{ab}	23,0±0,6 ^a	-21,9±0,9 ^d	-	-
	F10	3,9±0,0 ^a	36,5±0,7 ^a	23,5±0,1 ^a	-16,5±0,0 ^a	-	-
	F11	2,5±0,1 ^a	37,5±0,6 ^a	19,9±2,4 ^{ab}	-10,2±0,1 ^a	-	-
	F12	2,3±0,0 ^a	34,8±1,0 ^a	20,8±0,5 ^b	-19,3±0,7 ^c	-	-
PQ	F1	6,3±0,1 ^a	69,7±0,0 ^a	5,3±0,3 ^a	-1,4±0,3 ^a	0,61±0,3 ^a	>30 ^a
	F2	3,5±0,1 ^a	55,8±0,2 ^a	1,4±0,0 ^a	-0,6±0,1 ^a	>30 ^a	>30 ^a
	F3	2,8±0,0	36,4±0,3	1,2±0,1 ^a	-0,9±0,0 ^a	-	-
	F4	6,3±0,1 ^a	69,7±0,0 ^a	5,3±0,4 ^a	-1,4±0,3 ^a	-	-
	F5	5,8±0,0 ^a	67,0±0,6 ^a	3,1±0,1 ^a	-1,5±0,1 ^a	-	-
	F6	5,6±0,1 ^a	66,6±1,0 ^a	2,7±0,1 ^a	-0,7±0,2 ^a	-	-
	F7	6,3±0,1 ^a	69,7±0,0 ^a	5,3±0,4 ^a	-1,4±0,3 ^a	-	-
	F8	4,9±0,1 ^a	61,7±0,2 ^a	2,5±0,0 ^a	-1,6±0,2 ^a	-	-
	F9	4,0±0,1 ^a	61,4±0,0 ^a	2,6±0,4 ^a	-1,2±0,1 ^a	-	-
	F10	6,3±0,1 ^a	69,7±0,0 ^a	5,3±0,4 ^a	-1,4±0,3 ^a	-	-
	F11	4,6±0,1 ^a	65,9±0,5 ^a	4,5±0,2 ^a	-0,7±0,1 ^a	-	-
	F12	4,5±0,1 ^a	64,1±1,0 ^a	2,9±0,0 ^a	-0,9±0,1 ^a	-	-

*Cada valor se determinó en dos oportunidades y por duplicado (n=4 ± desviación estándar)

F₁₋₁₂: Formulación de las películas según Tabla 1; PVA: Permeabilidad al vapor de agua; S: solubilidad; R: fuerza de ruptura; E: Extensibilidad; PO₂: Permeabilidad al oxígeno; PCO₂: Permeabilidad al dióxido de carbono; PAS: Película de alginato de sodio al 2% (p/v); PQ: Película de quitosano al 2% (p/v).

Diferentes letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i) en una misma columna, indica diferencia significativa (p<0,05) entre condición por cada parámetro evaluado.

TABLA 3

Actividad antimicrobiana de películas comestibles elaboradas a base de alginato de sodio al 2% (p/v) o películas de quitosano al 2% (p/v) con la incorporación de nisina, aceites esenciales de ajo y/o orégano.

Condición	Concentración			Zona de inhibición (mm)					
	Ni (UI/mL)	AEA (%)	AEO (%)	PAS			PQ		
				SE	SA	LM	SE	SA	LM
Control	0	0	0	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	2,7±0,3 ^a	1,4±1,9 ^a	2,3±3,3 ^a
Óptima	1000	0,25	0,25	19,3±1,1 ^b	29,9±1,4 ^b	35,5±0,1 ^b	15,0±0,2 ^b	34,1±2,8 ^b	33,6±0,1 ^b
Máxima	2000	0,5	0,5	36,9±4,0 ^c	52,3±3,6 ^c	45,6±1,6 ^c	43,6±3,0 ^c	49,4±4,6 ^c	46,3±0,7 ^c
Ni (UI/mL)	0	-	-	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	2,7±0,3 ^a	1,4±1,9 ^a	2,3±3,3 ^a
	1000	-	-	11,2±4,7 ^b	19,3±0,2 ^b	27,2±2,6 ^b	9,6±7,1 ^{ab}	33,9±1,1 ^b	27,2±1,6 ^b
AEA (%)	-	0	-	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	2,7±0,3 ^a	1,4±1,9 ^a	2,3±3,3 ^a
	-	0,25	-	0,0±0,0 ^a	8,5±0,1 ^b	10±2,7 ^b	1,9±0,9 ^a	10,6±2,8 ^b	6,8±1,1 ^b
AEO (%)	-	-	0	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	1,4±1,9 ^a	2,7±0,3 ^a	2,3±3,3 ^a
	-	-	0,25	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	2,5±0,4 ^a	3,6±0,4 ^a	4,3±0,9 ^a
AEO (%)	-	-	0,5	0,0±0,0 ^a	6,3±1,3 ^b	8,0±3,2 ^b	4,1±2,2 ^a	5,6±0,8 ^b	5,5±0,4 ^b

*Cada valor se determinó en dos oportunidades y por duplicado (n=4 ± desviación estándar)

Ni: Nisina; AEA: Aceite esencial de ajo; AEO: Aceite esencial de orégano; PAS: películas comestibles elaboradas a base de alginato de sodio al 2% (p/v); PQ: películas comestibles elaboradas a base de quitosano al 2% (p/v) SE: *Salmonella* Enteritidis; SA: *Staphylococcus aureus*; LM: *Listeria monocytogenes*.

Diferentes letras minúsculas (a, b, c, d, e, f, g) en una misma columna, indica diferencia significativa (p<0,05) entre condición por cada microorganismo y tipo de película.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA): En la Tabla 2 se muestran los valores de *PVA* obtenidos para las *PAS* y *PQ*. Se observó que las *PQ* tuvieron una mayor *PVA* ($p < 0,05$) en comparación con las *PAS*, entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} tanto en las películas controles como en aquellas con antimicrobianos añadidos. En las *PAS* y *PQ* se observó que la adición de compuestos lipídicos tales como los *AEA* y/o *AEO* afectó significativamente ($p < 0,05$) la *PVA*, ya que ésta disminuyó cuando los aceites esenciales de ajo y orégano fueron incorporados en la formulación; mientras que con la adición de nisina, ambas películas tuvieron una ligera disminución de la *PVA*. Sin embargo, cuando los tres antimicrobianos fueron incorporados dentro de las películas, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la *PVA* en comparación con las películas controles y en aquellas con la adición de cada uno de los antimicrobianos añadidos individualmente.

Permeabilidad a los gases: Las *PAS* entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} fueron significativamente ($p < 0,05$) más permeables al oxígeno y menos permeables al dióxido de carbono que las *PQ* controles no entrecruzadas (Tabla 2). No obstante, cuando la nisina y los *AEA* y *AEO* fueron incorporados juntos en la formulación de la película (combinación óptima), un aumento significativo ($p < 0,05$) de la permeabilidad al oxígeno y dióxido de carbono fue observado en ambos tipos de películas.

Solubilidad: Se observó que las *PAS* entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} tuvieron una menor solubilidad ($p < 0,05$) en comparación con las *PQ* no entrecruzadas, tanto en las películas controles como en aquellas con antimicrobianos añadidos (Tabla 2). En las *PAS* y *PQ* se notó que la solubilidad de las películas fue afectada ligeramente por la adición de la nisina y los *AEA* y/o *AEO* añadidos individualmente. Sin embargo, la solubilidad fue afectada significativamente ($p < 0,05$) cuando los tres antimicrobianos fueron incorporados dentro de las películas; ya que una menor solubilidad fue observada (Tabla 2).

Fuerza de ruptura y extensibilidad: Las *PAS* entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} necesitaron una mayor fuerza para su ruptura y fueron más extensibles que las *PQ* no entrecruzadas, tanto en las películas controles como en aquellas con antimicrobianos añadidos (Tabla 2). La incorporación de aceites esenciales y nisina en las formulaciones de las *PQ* causó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la fuerza a la ruptura y en la extensibilidad de la película

(Tabla 2). Cuando se incrementaba la concentración de estos compuestos antimicrobianos evaluados individualmente, la resistencia a la fuerza de ruptura y extensibilidad de las *PQ* era menor. La combinación de *AEA* y *AEO* junto con nisina disminuyeron aún más estas propiedades mecánicas (Tabla 2). Por su parte, las *PAS* disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) su fuerza de resistencia a la ruptura cuando concentraciones intermedias de aceites esenciales (0,25%) y nisina (1000 UI/mL) fueron aplicadas en la película. Este mismo comportamiento fue observado en la extensibilidad de la película con la aplicación de los antimicrobianos añadidos a la formulación, a excepción de la nisina, la cual disminuyó la extensibilidad de la película cuando mayores concentraciones fueron aplicadas. La combinación de nisina y *AEA* y *AEO* disminuyó las propiedades mecánicas de las *PAS* en comparación con las películas control (Tabla 2).

Microscopia electrónica de barrido (MEB): Las micrografías realizadas por *MEB* (Fig. 1) demostraron que las *PQ* al 2% (p/v) con nisina (1000 UI/ml) y aceites esenciales de ajo (0,25% v/v) y orégano (0,25% v/v) incorporados presentaron poros y grietas en comparación a las *PAS* al 2% (p/v) con nisina (1000 UI/ml) y aceites esenciales de ajo (0,25% v/v) y orégano (0,25% v/v), las cuales presentaron una superficie más lisa y compacta, sin poros y grietas.

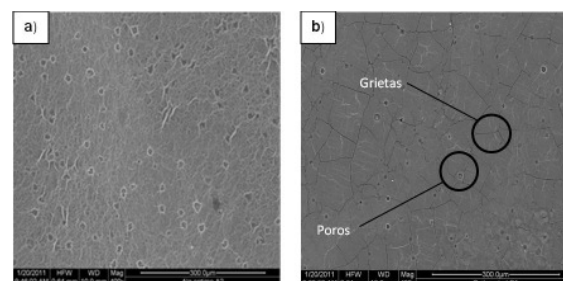


Fig. 1. Micrografías tomadas por microscopia electrónica de barrido (MEB) de las películas comestibles de alginato de sodio al 2% (a) y de quitosano al 2% (b).

Propiedades antimicrobianas: Las *PQ* sin nisina y aceites esenciales de ajo y orégano demostraron tener efectos antimicrobianos significativos ($p < 0,05$) por si solas (Tabla 3). En contraste, ningún efecto antimicrobiano significativo ($p > 0,05$) fue encontrado en esas *PAS* (Tabla 3). Las películas que contenían nisina sola, exhibieron los mayores halos de inhibición ($p < 0,05$) en comparación con aquellas películas que contenían aceite esencial de ajo u orégano solos. Se observó que a medida que se aumentó la concentración

de antimicrobianos, también se aumentó la zona de inhibición, tanto para las *PAS* como para las *PQ*. La combinación de nisina, *AEA* y *AEO* fue más efectiva que cada una aplicada individualmente (Tabla 3). La nisina y los *AEA* y *AEO* evaluados individualmente fueron más efectivos contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* que contra *Salmonella* Enteritidis. Este mismo comportamiento fue observado cuando los compuestos antimicrobianos fueron agregados juntos en la formulación de ambas películas.

DISCUSIÓN

La combinación óptima de los antimicrobianos añadidos a las *PAS* y *PQ* arrojada por el diseño factorial de múltiples niveles, generó una combinación para cada tipo de película, el cual comprobó que se obtuvieron las mejores propiedades de barrera, mecánicas y antimicrobianas. Con la selección de esta combinación óptima en la formulación de las *PAS* y *PQ* se buscó usar la mínima cantidad de las sustancias incorporadas para obtener la máxima eficiencia en estas propiedades.

La *PVA* indica la capacidad que tiene el material para permitir el paso del vapor de agua a través de él; por lo tanto, se requiere una permeabilidad baja para tener una mayor resistencia al paso del vapor de agua y de éste modo mantener por mayor tiempo la frescura de los alimentos. Los resultados obtenidos en la Tabla 2 mostraron cómo las *PQ* presentaron mayores valores de *PVA* que las *PAS* entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} . Esto es debido probablemente a la adición del cloruro de calcio al 3% a las formulaciones de alginato de sodio, ya que este interactúa con el alginato de sodio, favoreciendo así la formación de películas más compactas con poros mucho más pequeños y con mayor resistencia a la *PVA* [31]. Resultados similares son presentados por Arias y col. [31], quienes reportaron que películas de alginato de sodio al 2% con la adición de aceite esencial de orégano y carbonato de calcio (0,2%) presentaron una menor *PVA* en relación a las películas sin adición de calcio. En contraste, Buonocore y col. [32] señalaron que *PQ* presentaron menor *PVA* en relación a películas hechas con caseína y alginato. Los resultados de la Tabla 2 mostraron además, cómo la adición de antimicrobianos, y en especial los aceites esenciales, dentro de las formulaciones de *PAS* y *PQ* disminuyeron la *PVA* en comparación a la condición control (sin antimicrobianos). Esto ocurre debido a que la difusión de vapor de agua a través de la película ocurre a través de las zonas hidrofílicas y la incorporación de sustancias hidrofóbicas como

los aceites esenciales, causan un comportamiento en contra de la transferencia de humedad; por lo que al aumentar la concentración de aceite esencial de orégano y/o ajo, la transferencia de vapor de agua a través de las películas disminuye significativamente. Resultados similares fueron reportados por Rojas-Graü y col. [16], quienes reportaron valores de $6,17 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa para las películas elaboradas a base de puré de manzana conteniendo 0,1% de aceite de orégano. Maizura y col. [27] obtuvieron valores que van de $5,1 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa para películas de almidón de sago-alginato hasta $4,9 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa para esa misma película, pero conteniendo 0,3% de aceite esencial de limón. Aun cuando en esta investigación no se evaluó el efecto del uso de diferentes concentraciones de glicerol como agente plastificante, se conoce que este aditivo puede disminuir las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del biopolímero, incrementado la *PVA* [27,33,34]. Su presencia en la matriz polimérica la hace menos densa, y en consecuencia, existe más espacio para que las moléculas de agua migren, favoreciendo la adsorción y desorción de las moléculas de agua [33]. Los grupos polares (-OH) presentes a lo largo de las cadenas del agente plastificante favorecen el desarrollo de enlaces de hidrógeno entre el agente plastificante y el biopolímero, y como resultado, se consigue una mayor flexibilidad y permeabilidad en las películas [35]. Este mismo efecto puede ser atribuido a la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono de las *PQ* y *PAS*, el cual pudo aumentar cuando el agente plastificante fue incorporado en las películas. Estos resultados demuestran que los materiales no polares como los lípidos pueden actuar como excelentes barreras a la humedad, pero son pocos efectivos como barrera a los gases [16, 39].

La solubilidad en agua de las películas evaluadas a temperatura ambiente ($T= 25^{\circ}\text{C}$) fue influenciada significativamente por el tipo de polímero, la concentración del mismo, y la incorporación de sustancias hidrofóbicas a la formulación de la película. Adicionalmente, otros factores como la incorporación de glicerol pudieron afectar la solubilidad de las películas debido a sus propiedades hidrofílicas, interaccionando sus moléculas fuertemente con el agua y formando una red de enlaces de hidrógeno que favorece la solubilidad [27]. Al comparar la solubilidad de las *PQ* con las *PAS* entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} , se observó que la solubilidad de las *PQ* fue mayor que las *PAS*. Por lo tanto, las *PAS* mostraron ser más resistentes al agua, y mantuvieron mejor su integridad en medio acuoso. Este hecho pudiera ser atribuido a la adición del cloruro de calcio al 3% en la formulación de la película. Los iones de

calcio interactúan con las moléculas de alginato de sodio y originan mayores fuerzas intermoleculares (entrecruzamiento), formando redes tridimensionales que favorecen la insolubilidad de las películas en medio acuoso [36]. Por otra parte, la naturaleza lipídica de los aceites esenciales agregados a la formulación también afectó la solubilidad de las películas. Esto es debido a que aumentan las proporciones hidrofóbicas de la película, y por ende se hace más insoluble en agua, ya que se limitan las interacciones entre el agua y la matriz formada [37]. La menor solubilidad de las PAS entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} con la adición de AEA y AEO, las hace más efectivas que las PQ no entrecruzada para ser utilizadas como recubrimientos en alimentos con una alta actividad de agua tales como: frutas y carnes, ya que pueden mantener mejor su integridad física.

Las PAS entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} fueron más elásticas y resistentes que las PQ no entrecruzada. Esto puede ser evidenciado en las micrografías del MEB, donde poros y grietas demuestran la debilidad de las PQ. Resultados similares fueron reportados por Villagómez y col. [38], quienes reportaron una mayor flexibilidad y resistencia en las películas de alginato solas o mezcladas con carragenina, en comparación con las películas de proteína de suero. Este hecho pudiera atribuirse a que los iones Ca^{+2} provenientes del cloruro de calcio añadido a las formulaciones de alginato de sodio ocupan los pequeños espacios entre los filamentos de la película lo que resulta en una estructura más resistente [36].

Los resultados de la evaluación de las propiedades antimicrobianas de las PAS y PQ con nisina y AEA y AEO incorporados demostraron una mayor efectividad sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus* (microorganismos Gram-positivos) que sobre *Salmonella* Enteritidis (microorganismo Gram-negativo). Este hecho es atribuido a la membrana externa que poseen las bacterias Gram-negativas, la cual crea una barrera adicional y semipermeable a ciertas sustancias, obteniendo así una mayor resistencia antimicrobiana [5]. Por el otro lado, es bien sabido que la nisina actúa principalmente sobre bacterias Gram-positivas a nivel de la membrana citoplasmática, originando poros que causan pérdida de compuestos citoplasmáticos, inhibición del transporte de los aminoácidos, despolarización de la membrana y en consecuencia muerte celular [5]. Por su parte, el mecanismo de acción de los aceites esenciales no está totalmente definido, por la diversidad de componentes activos que pueden contener, se le atribuyen diferentes modos de acción como degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática y a las proteínas de la

membrana, coagulación del citoplasma entre otros [5,40]. La acción antimicrobiana del aceite esencial de ajo ha sido atribuida principalmente a la alicina [3]; mientras que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano es debida a la alta concentración de compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol [41]. En consecuencia, diversos autores han reportado el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y nisina adicionado a películas. De este modo, Pranoto y col. [3] reportaron que *S. aureus* y *B. cereus* son más sensibles al aceite esencial de ajo incorporado en películas de alginato de sodio, que *E. coli* y *S. Typhimurium*. De igual manera, Seydim y Sarikus [42] elaboraron películas de proteína de suero y le adicionaron aceite esencial de ajo, orégano y romero en concentraciones de 1% a 4% (p/v). Ellos evaluaron sus propiedades antimicrobianas frente a *E. coli* O157: H7, *S. aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *L. monocytogenes* y *L. plantarum*, y encontraron una mayor efectividad antimicrobiana cuando se añadieron aceites esenciales de orégano (2%) y ajo (3%).

CONCLUSIONES

Formulaciones con películas a base de alginato de sodio al 2 % (p/v) y a base de quitosano al 2% (p/v), ambas, con nisina (1000 UI/mL), AEA (0,25% v/v) y AEO (0,25% v/v) fueron obtenidas con éxito, sin embargo, las PAS con nisina, AEA y AEO entrecruzadas iónicamente con Ca^{+2} , mostraron mejores propiedades que las PQ con nisina, AEA y AEO no entrecruzada iónicamente con Ca^{+2} ; principalmente por ser menos insolubles en agua, presentar una baja permeabilidad al vapor de agua y a los gases, presentar mayor resistencia a la ruptura y servir de transportadoras de sustancias antimicrobianas para poder inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *S. aureus*, por lo que películas de esta naturaleza pueden ser sugeridas para recubrir alimentos con una alta actividad de agua tales como: frutas y carnes, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento otorgado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) bajo el incentivo número P-200900482, y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) bajo el proyecto de grupo número PG-03-7374-2008.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hernández-Izquierdo VM, Krochta JM.

Thermoplastic processing of proteins for film formation-A review. *J Food Sci.* 2008; 73 (2): R30-R39.

[2] Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 2004; 21: 703-714.

[3] Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensm Wiss Technol.* 2005; 38: 859-865.

[4] Cha D, Chinnan M. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44 (4): 223-237.

[5] Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *CRFSFS.* 2009; 8: 157-180.

[6] Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm Wiss Technol.* 2004; 37: 263-268.

[7] Busatta C, Vidal RS, Popielski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, Corazza C, Corazza ML, Vladimir-Oliveira J, Cansian RL. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol.* 2008; 25: 207-211.

[8] Mahmoud BSM, Yamazaki K, Miyashita K, Il-Shik S, Dong-Suk C, Suzuki T. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiol.* 2004; 21: 657-666.

[9] Liang Z, Mittal GS, Griffiths MW. Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *J Food Prot.* 2002; 65: 1081-1087.

[10] Iu J, Mittal GS, Griffiths MW. Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *J Food Prot.* 2001; 64: 964-969.

[11] Fernandez-Saiz P, Lagaron JM, Ocio JM. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food hydrocolloids. Food Hydrocolloids.* 2009; 23: 913-921.

[12] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int J Food Microbiol;* 2004; 94: 223-253.

[13] Pranoto Y, Salokhe VM, Rakshit SK. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Res Int.* 2005; 38: 267-272.

[14] Davidson PM, Zivanovic S. The use of natural

antimicrobials. En: Zeuthen P, BoghSorensen L, Eds. *Food preservation techniques.* Boca Raton, USA: CRC Press LLC. 2003. p 5-30.

[15] Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453-462.

[16] Rojas-Grau M, Avena-Bustillos R, Friedman M, Henika, P, Martín-Belloso O, McHugh T. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple pure edible films containing plant essential oils. *J Agric and Food Chem.* 2006; 54: 2962-2966.

[17] Dawson P, Carl G, Acton J, Han I. Efecto de películas a base de soya impregnadas con ácido láurico y nisina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en mortadela de pavo. *Mundo Lácteo y Carne.* 2007; [en línea] Disponible en: URL: <http://www.alimentariaonline.com>.

[18] Duan J, Park S, Daeschel M, Zhao Y. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *J Food Sci.* 2007; 72 (9): M355-M362.

[19] Raybaudi-Massilia RM, Rojas-Graü MA, Mosqueda-Melgar J, Martín-Belloso O. Comparative study on essential oils and their active compounds incorporated in alginate-based edible coating to assure the safety and quality of fresh-cut Fuji apples. *J Food Prot.* 2008; 71 (6): 1150-1161.

[20] Hurst A. Nisin. *Adv Appl Microbiol.* 1981; 27: 85-123.

[21] Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G, Dasiou D, Ambrosiadis I. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microb Cell Fact.* 2006; 5: 30-44.

[22] Maldonado R, Llanca L. Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Rev Fac Agron (Maracay).* 2007; 33 (3): 147-163.

[23] Neetoo H, Ye M, Chen H, Joerger R, Hicks D, Hoover D. Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol.* 2008; 122: 8-15.

[24] Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium present in bologna and ham. *J Food Prot.* 2007; 70 (4): 901-908

[25] Tapia MS, Rojas-Graü MA, Rodríguez FJ, Ramírez J, Carmona A, Martín-Belloso, O. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings

on fresh-cut fruits. *J Food Sci.* 2007; 72: E190-E196.

[26] ASTM. Standard Test Method for Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and Sheeting, ASTM 1434 - 82, 2009, p 1-8.

[27] Maizura M, Fazilah M, Norziah M, Karim A. Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyze sago starch – alginate edible film containing lemongrass oil. *J Food Sci.* 2007; 72 (6): 324-330.

[28] ASTM. “Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting”, ASTM 882-02, 2002, p 1-9.

[29] Davidson PM, Parish ME. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Tech.* 1989; 43: 148-155.

[30] Bauer A, Kyrby W, Sherris J, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1996; 45: 439-496.

[31] Arias-Cruzado E, Torres-Bojórquez AE, Pérez-Pérez C. Caracterización de las Propiedades Mecánicas y de Barrera al Vapor de Agua en Empaques Comestibles a Base de Alginato de Sodio y Aceite Esencial de Orégano. IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2007; [En línea] Disponible en: URL: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/...2007/.../CNCA-2007-4.pdf>

[32] Buonocore G, Conte A, Del Nobile A. Use of a Mathematical Model to Describe the Barrier Properties of Edible Films. *J. Food Sci.* 2005; 70(2): E142-E147.

[33] Mali S, Grossmann V, Garcia M, Martino M, Zaritzky N. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydr Polym.* 2004; 56: 129-135.

[34] Bertuzzi M, Armada M, Gottifredi J, Aparicio A, Jimenez P. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología.

2002; [En línea] Disponible en: URL: <http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/CD%20INTERACTIVOS/NOA2002/Estudio%20permeabilidad%20vapor.pdf>

[35] Nevena N, Vladislava S, Vera L. Effect of glycerol content and pH value of film-forming solution on the functional properties of protein-based edible films. *APTEFF.* 2010; 41: 201-203.

[36] Fabra M, Talens P, Chiralt A. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *J Food Eng.* 2010; 96: 356-364.

[37] Romero C, Bello L, García M, Martino M, Solorza J, Zaritzky, N. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydr Polym.* 2005; 60: 235-244.

[38] Villagómez D, Gómez C, San Martín E, Pérez J, Vernon E, Pedroza R. Comparative study of the mechanical properties of edible films made from single and blended hydrophilic biopolymer matrices, *Rev Mex Ing Quim.* 2008; 7(3): 263-273.

[39] McHugh TH, Avena-Bustillos R, Krochta JM. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water permeability and explanation of thickness effects. *J Food Sci.* 1993; 58(4): 899-903.

[40] Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* 2008; 78 (1-2): 90-103.

[41] Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Food Prot.* 2006; 69(10): 2364-2369.

[42] Seydim A, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int.* 2006; 39 (5): 639-644.