



Tesis de Doctorado en Química:

“Desarrollo de película comestible biopolimérica con incorporación de nanopartículas bioactivas de potencial aplicación en productos alimentarios”

Ing. Alim. Patricia Zimet, MSc

Directores:

Dr. Álvaro Mombrú

Dra. Helena Pardo

Dra. Caterina Rufo

Montevideo-Pando, Uruguay

Mayo 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Caterina Rufo, Helena Pardo y Álvaro Mombrú, por el apoyo constante a lo largo de este proceso, tanto a nivel académico como personal.

A mis compañeros de Nanomat, Analía Castro, Juan Pablo Villanueva, Pablo Miranda y Luciana Pereira por su apoyo y colaboración en todo momento.

A mis colegas del laboratorio de Alimentos y Nutrición, en particular a Giannina Brugnini y a Soledad Rodríguez por su ayuda en los ensayos microbiológicos. Al laboratorio de Biotecnología, a Iris Miraballes y a Silvina Rossi. Al laboratorio de Bioanalítica y UMADD por su buena disposición para utilizar sus equipos.

A Ricardo Faccio, Mariano Romero y Dominique Mombrú por su ayuda y conocimiento en técnicas de caracterización.

A Álvaro Olivera (CURE, Rocha) por su apoyo en los estudios de TEM. A Daniel Molinari (Facultad de Química) por su apoyo en los análisis de permeabilidad. A Alejandro Marquez (Facultad de Ciencias) por su apoyo en estudios SEM. A Patricia Lema, Erika Paulsen y Sofía Barrios (Facultad de Ingeniería) por su colaboración en los ensayos de propiedades mecánicas.

A PEDECIBA, ANII (POS_NAC_2013_1_11431), CSIC (INI_2013_ 213) y CAP por su apoyo financiero.

A mis padres, a Nico, a Tomi y a Gery.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	16
RESUMEN.....	18
1 INTRODUCCIÓN	20
1.1 Envases biopoliméricos	20
1.1.1 Antecedentes.....	20
1.1.2 Biopolímeros.....	21
1.1.3 Películas biopoliméricas	21
1.1.4 Películas antimicrobianas	23
1.1.5 Películas bionanocompuestas	25
1.2 Quitosano	26
1.2.1 Características.....	26
1.2.2 Nanopartículas de quitosano	28
1.2.3 Biopelículas de quitosano.....	30
1.2.4 Carboximetil quitosano	31
1.2.5 Biopelículas de carboximetil quitosano.....	32
1.3 Alginato	34
1.3.1 Características.....	34
1.3.2 Micro y nanopartículas de alginato	35

1.3.3	Nanopartículasde alginato/quitosano.....	36
1.4	Nisina.....	38
1.4.1	Características.....	38
1.4.2	Actividad antimicrobiana.....	40
1.4.3	Activida antibacteriana en carne.....	42
1.4.4	Nanoencapsulación de nisina.....	43
1.4.5	Incorporación de nisina en películas biopoliméricas.....	44
1.4.6	Incorporación de nanopartículas de nisina a películas alimentarios.....	47
2	OBJETIVOS.....	48
2.1	Objetivo general.....	48
2.2	Objetivos específicos.....	48
2.3	Justificación.....	49
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1	Materiales.....	51
3.2	Cepa bacteriana.....	51
3.3	Técnicas experimentales.....	51
3.3.1	Método del ácido bicinconínico.....	51
3.3.2	Diseño experimental.....	52
3.3.3	Dispersión de luz dinámica.....	52
3.3.4	Dispersión de luz electroforética.....	53
3.3.5	Microscopía electrónica de transmisión.....	54
3.3.6	Microscopía de fuerza atómica.....	55
3.3.7	Espectroscopía Raman.....	55
3.3.8	Síntesis de películas biopoliméricas.....	56

3.3.9	Microscopía electrónica de barrido.....	56
3.3.10	Propiedades mecánicas de películas biopoliméricas.....	57
3.3.11	Propiedades térmicas de películas biopoliméricas.....	58
3.3.12	Difracción de rayos X	58
3.3.13	Opacidad de películas biopoliméricas	59
3.3.14	Permeabilidad al vapor de agua de películas biopoliméricas.....	59
3.3.15	Solubilidad de películas biopoliméricas.....	60
3.4	Procedimiento experimental	60
3.4.1	Cuantificación de nisina.....	60
3.4.2	Síntesis de nanopartículas de quitosano/tripolifosfato pentasódico con nisina	61
3.4.3	Síntesis de nanopartículas de alginato/quitosano con nisina	62
3.4.4	Diseño experimental y optimización de la formulación.....	63
3.4.5	Eficiencia de encapsulación de nanopartículas.....	65
3.4.6	Tamaño de partícula.....	66
3.4.7	Potencial zeta	66
3.4.8	Microscopía electrónica de transmisión	66
3.4.9	Microscopía de fuerza atómica	66
3.4.10	Espectroscopía Raman.....	67
3.4.11	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de nanopartículas.....	67
3.4.12	Actividad antimicrobiana en carne de nanopartículas	69
3.4.13	Preparación de soluciones formadoras de películas de quitosano con nanopartículas	70
3.4.14	Preparación de soluciones formadoras de películas de quitosano y carboximetil quitosano.....	71
3.4.15	Síntesis de películas biopoliméricas.....	72

3.4.16	Microscopía electrónica de barrido.....	72
3.4.17	Determinación del espesor de películas biopoliméricas	72
3.4.18	Propiedades mecánicas de películas biopoliméricas.....	72
3.4.19	Propiedades térmicas de películas biopoliméricas.....	73
3.4.20	Difracción de rayos X	74
3.4.21	Opacidad de películas biopoliméricas	74
3.4.22	Permeabilidad al vapor de agua	74
3.4.23	Solubilidad de películas biopoliméricas.....	75
3.4.24	Actividad antimicrobiana de películas biopoliméricas	75
3.4.25	Tratamiento estadístico	76
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1	Cuantificación de nisina	77
4.2	Nanopartículas de quitosano/TPP con nisina	78
4.2.1	Determinación de parámetros para formación de nanopartículas	78
4.2.2	Eficiencia de encapsulación.....	80
4.3	Nanopartículas de alginato/quitosano con nisina	81
4.3.1	Diseño experimental y metodología de superficie de respuesta.....	81
4.3.2	Optimización de la formulación y validación del modelo	85
4.3.3	Morfología y tamaño	86
4.3.4	Espectroscopía Raman.....	87
4.3.5	Determinación de concentración mínima inhibitoria	90
4.3.6	Determinación de concentración mínima bactericida.....	92
4.3.7	Inhibición del crecimiento a 4 °C.....	93
4.3.8	Estudios antibacterianos en carne vacuna envasada a vacío	96

4.4	Biopelículas de quitosano con nanopartículas de nisina	98
4.4.1	Morfología	98
4.4.2	Espesor.....	100
4.4.3	Propiedades ópticas	102
4.4.4	WVP	103
4.4.5	Solubilidad en agua.....	104
4.4.6	Propiedades mecánicas	105
4.4.7	Propiedades térmicas.....	106
4.4.8	XRD	108
4.4.9	Actividad antimicrobiana.....	109
4.5	Biopelículas de quitosano/carboximetil quitosano con nisina	110
4.5.1	Morfología	110
4.5.2	Espesor.....	112
4.5.3	Propiedades ópticas	113
4.5.4	WVP	114
4.5.5	Solubilidad en agua.....	115
4.5.6	Propiedades mecánicas	116
4.5.7	Propiedades térmicas.....	118
4.5.8	XRD	120
4.5.9	Actividad antimicrobiana.....	123
4.5.10	Evaluación cualitativa	125
5	CONCLUSIONES	126
6	PERSPECTIVAS.....	129

7 BIBLIOGRAFÍA.....	130
Anexo 1: Caracterización de quitosano y carboximetil quitosano.....	147
Anexo 2: Ensayos preliminares de películas de quitosano/carboximetil quitosano.....	153
Anexo 3: Publicaciones y ponencias.....	155

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de películas biopoliméricas con agentes antimicrobianos en distintos alimentos.	24
Tabla 2. Aplicaciones de películas de CS en alimentos.	31
Tabla 3. Biopelículas de CMCS y sus aplicaciones.	33
Tabla 4. Aplicación de NIS en alimentos (119).	41
Tabla 5. Películas conteniendo NIS para preservación de productos cárnicos.....	46
Tabla 6. Variables independientes y dependientes del diseño experimental de Box-Behnken..	63
Tabla 7. Diseño experimental de Box-Behnken.	64
Tabla 8. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintos niveles de ácido acético en nanopartículas CS/TPP vacías.....	79
Tabla 9. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintas relaciones CS/TPP (v/v) en nanopartículas CS/TPP vacías.	79
Tabla 10. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintas relaciones CS/TPP (p/p) en nanopartículas CS/TPP con NIS.	80
Tabla 11. Respuestas (Y_1 = EE (%), Y_2 = tamaño de partícula (nm), Y_3 = potencial zeta (mV)) observadas para las nanopartículas de ALG/CS con NIS preparadas según diseño experimental (X_1 = ALG (mg/ml), X_2 = ALG/CS (p/p), X_3 = Nisaplin® (mg/ml)).	82
Tabla 12. Resumen del análisis de regresión de las tres respuestas para los modelos cuadráticos.....	82
Tabla 13. Efecto de NIS libre y de las nanopartículas de ALG/CS (NPs) cargadas con NIS sobre <i>L. monocytogenes</i> (UFC/g) en carne magra durante el almacenamiento a 4 °C.	97

Tabla 14. Espesor de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.....	101
Tabla 15. Opacidad de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.....	102
Tabla 16. WVP de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.....	103
Tabla 17. Solubilidad de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.....	104
Tabla 18. Propiedades mecánicas de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.....	105
Tabla 19. Temperaturas máximas (T_p) de las películas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) de ALG/CS, obtenidas por DSC, para proceso endotérmico (primer ciclo de calentamiento, 30-180 °C) y exotérmico (segundo ciclo de calentamiento, 30-320 °C).	106
Tabla 20. Espesor de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.	113
Tabla 21. Opacidad (A_{600}/mm) de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.....	114
Tabla 22. WVP de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.	115
Tabla 23. Solubilidad en agua de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.....	116
Tabla 24. Propiedades mecánicas de las películas con diferentes relaciones de masa CS/CMCS y concentración variable de NIS: esfuerzo máximo (σ_{max}) y deformación de rotura (ϵ).....	117

Tabla 25. Temperaturas máximas (T_p) de las películas con diferentes relaciones de masa CS/CMCS y concentraciones variables de NIS, obtenidas por DSC, para proceso endotérmico (primer ciclo de calentamiento, 30-180 °C) y exotérmico (segundo ciclo de calentamiento, 30-320 °C)..... 118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de celulosa, quitina y CS (50).	27
Figura 2. Estructura de nanopartículas de CS reticuladas con TPP (55).....	29
Figura 3. Estructura de los distintos tipos de CMCS (78).	32
Figura 4. Estructura química de ALGs compuestos por: bloques G, bloques M y G y M intercaladas (99).	34
Figura 5. Representación de estructura de “caja de huevos” formada por bloques de ácido gulurónico reticulados por Ca^{2+} (101).....	35
Figura 6. Ilustración esquemática de interacciones electrostáticas entre ALG y CS (105).	37
Figura 7. Estructuras de las moléculas de NIS A y Z (119).....	39
Figura 8. Microplaca para determinación de CMI y CMB.....	68
Figura 9. Texturómetro utilizado para determinación de las propiedades mecánicas de las biopelículas mediante ensayos de tracción.....	73
Figura 10. Medidas de absorbancia de soluciones de NIS (0 a 200 $\mu\text{g/ml}$) utilizando el ensayo de BCA con incubación a 60 °C por 60 min. Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.	77
Figura 11. Curvas de calibración de NIS mediante ensayo de BCA con incubación de: (●) 30 min a 60 °C y (■) 60 min a 60 °C. Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.....	78
Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta 3D y contorno de respuesta generados a partir del diseño de Box-Behnken: (a), (b) efecto de la concentración de Nisaplin® y de ALG sobre la EE para relación ALG/CS= 5 (p/p); (c), (d) efecto de la relación ALG/CS y el contenido de Nisaplin®	

sobre el tamaño de partícula para ALG= 0.5 mg/ml; (e), (f) efecto del contenido de Nisaplin® y la relación ALG/CS (p/p) sobre el potencial zeta para ALG= 0.5 mg/ml.....	84
Figura 13. Observaciones de TEM de nanopartículas de ALG/CS con NIS.	86
Figura 14. Micrografías de fuerza atómica en (a) 3D, (b) 2D y (c) curva de distribución del tamaño de las nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS. El análisis topográfico se obtuvo a partir de la sección marcada con líneas en las imágenes.....	87
Figura 15. Espectros Raman de ALG, CS, NIS, ALG/CS y nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS.	88
Figura 16. Espectros Raman de NIS, ALG/CS y nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS.	89
Figura 17. Inhibición del crecimiento (%) de <i>L. monocytogenes</i> por NIS y nanopartículas de NIS, luego de 24 h de incubación a 37 °C.....	91
Figura 18. Inhibición del crecimiento (%) de <i>L. monocytogenes</i> por NIS y nanopartículas de NIS, luego de 48 h de incubación a 37 °C.....	92
Figura 19. Determinación de CMB luego de 24 h a 37 °C de: (a) nanopartículas de ALG/CS con NIS y (b) NIS libre.	93
Figura 20. Determinación de CMB luego de 48 h a 37 °C de: (a) nanopartículas ALG/CS con NIS y (b) NIS libre.	93
Figura 21. Monitoreo del crecimiento bacteriano (A_{600}) de <i>L. monocytogenes</i> a 4 °C, suplementado con: (●) 125 UI/ml de NIS en forma de nanopartículas ALG/CS con NIS, (■) 125 UI/ml de NIS libre y (▲) muestras control (sin tratamiento). Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.....	94
Figura 22. Muestras de carne magra luego de inoculación con <i>L. monocytogenes</i> y tratamiento con: (a) NIS libre en 400 UI/ml, (b) NIS libre en 800 UI/ml; nanopartículas cargadas con NIS en (c) 400 UI/ml, (d) 800 UI/ml y (e) control (sin tratamiento).....	96

Figura 23. Películas de: (a) CS y de CS con (b) 1000 UI/ml de NIS, (c) 6000 UI/ml de NIS, (d) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente).....	99
Figura 24. Micrografías obtenidas por SEM de la superficie de las películas de (a) CS y de CS con: (b) NIS a 1000 UI/ml, (c) NIS a 6000 UI/ml, nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente). 100	
Figura 25. Micrografías obtenidas por SEM del corte transversal de películas de (a) CS y de CS con: (b) NIS a 1000 UI/ml, (c) NIS a 6000 UI/ml, nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente).	100
Figura 26. Termogramas de las películas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) de ALG/CS, obtenidos por DSC (segundo ciclo de calentamiento): (a) control, (b) NIS 1000 UI/ml, (c) NPs 1000 UI/ml, (d) NIS 6000 IU/ml y (e) NPs 6000 UI/ml.	107
Figura 27. Difractogramas de películas de CS: (a) control, (b) con NIS 1000 UI/ml, (c) con NIS 6000 UI/ml, (d) con nanopartículas ALG/CS en 1000 UI/ml, y (e) con nanopartículas ALG/CS en 6000 UI/ml.	108
Figura 28. Zonas de inhibición de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en pruebas de difusión en agar de biopelículas de CS (a) control, (b) con nanopartículas (NPs) ALG/CS en concentración equivalente de 6000 UI/ y (c) con NIS 6000 UI/ml.	109
Figura 29. Imágenes de películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.	110
Figura 30. Micrografías obtenidas por SEM de la superficie de las películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a: (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.....	111

Figura 31. Micrografías obtenidas por SEM de la sección transversal de las películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a: (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.	112
Figura 32. Termogramas obtenidos por DSC (segundo ciclo de calentamiento) de películas con NIS (6000 UI/ml) con relaciones CS/CMCS (p/p) de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p).....	120
Figura 33. Difractogramas de: (a) películas control con diferentes relaciones de masa CS/CMCS, y de películas incorporadas en NIS con relaciones de masa CS/CMCS de: (b) 100/0, (c) 95/5, (d) 90/10, (e) 85/15 y (f) 80/20 (p/p). Para las películas incorporadas con NIS, se agregó NIS a 1000 y 6000 UI/ml.....	122
Figura 34. Zonas de inhibición de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en pruebas de difusión en agar de biopelículas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a (1) 1000 UI/ml y (2) 6000 UI/ml.	123
Figura 35. Diámetro de las zonas de inhibición de las películas conteniendo NIS (6000 UI/ml) con relaciones CS/CMCS de 100/0, 95/5, 90/10, 85/15 y 80/20 (p/p).....	124
Figura 36. Películas comestibles aplicadas a trozos de carne, elaboradas con: (a) CS, (b) CS y CMCS, (c) CMCS, donde (1) corresponde a t=0 y (2) corresponde a t=21 días.	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	microscopía de fuerza atómica
ALG	alginato
BAL	bacterias ácido-lácticas
BCA	método del ácido bicinconínico
CMCS	carboximetil quitosano
CMB	concentración mínima bactericida
CMI	concentración mínima inhibitoria
CS	quitosano
DD	grado de desacetilación
DLS	dispersión dinámica de la luz
DS	grado de sustitución
DSC	calorimetría diferencial de barrido
EE	eficiencia de encapsulación
FDA	Administración de drogas y alimentos en EE.UU.
GRAS	generalmente reconocido como seguro
HPH	homogenización por altas presiones
HPMC	hidroxipropilmetil celulosa
HREM	microscopía electrónica de alta resolución

LSD	test de diferencia mínima significativa de Fisher
M_v	peso molecular viscosímetro
NIS	nisina
PDI	índice de polidispersión
PEC(s)	complejo(s) de polielectrolito(s)
pI	punto isoeléctrico
PPG	polipropilenglicol
RSM	metodología de superficie de respuesta
SEM	microscopía electrónica de barrido
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TSB-YE	caldo triptona soja-extracto de levadura
TPP	tripolifosfato pentasódico
WVP	permeabilidad al vapor de agua
WVTR	tasa de transmisión del vapor de agua
XRD	difracción de rayos X

RESUMEN

Los envases alimentarios activos pueden ser diseñados para reducir y controlar efectivamente la aparición de microorganismos patógenos y de deterioro, y por ende contribuir a la inocuidad y a prolongar la vida útil de los alimentos. Una alternativa de creciente interés dentro del área de envasado es el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles y biodegradables a partir de productos naturales. Debido a sus propiedades únicas, los biopolímeros tales como el quitosano (CS) pueden ser utilizados como componentes principales de películas y recubrimientos. En particular, las películas biopoliméricas pueden contener diversos aditivos para mejorar su funcionalidad, tales como agentes antimicrobianos. La nisina (NIS) es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* que presenta actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes* y es la única bacteriocina Generalmente Reconocida Como Segura (GRAS). Sin embargo, su actividad en alimentos está limitada por varios factores por lo que es posible recurrir a la utilización de técnicas de nanoencapsulación para preservar la actividad y controlar la liberación de dicho compuesto.

El objetivo del presente trabajo consistió en el desarrollo de películas biopoliméricas a base de CS con actividad antibacteriana para extender la vida útil de alimentos, en especial productos cárnicos. Las estrategias planteadas comprendieron, por una parte, la incorporación de nanopartículas de CS conteniendo NIS a una película biopolimérica a base de CS, y por otra, la formación de películas compuestas de CS y carboximetil quitosano (CMCS) con NIS libre.

Como sistemas de nanoencapsulación de NIS, se estudiaron la reticulación de CS con tripolifosfato de sodio (TPP) y la formación de complejos alginato (ALG)/CS. Dado que el primer sistema no logró encapsular a la bacteriocina, se continuó el trabajo con el sistema de ALG/CS. Para optimizar la formulación de las nanopartículas, se utilizó un modelo experimental de Box-Behnken y metodología de superficie de respuesta. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas y se confirmó la interacción entre sus componentes. Asimismo, las nanopartículas exhibieron actividad antibacteriana en estudios antimicrobianos *in vitro*. Por otra parte, se observó que el tratamiento con nanopartículas fue más efectivo que la bacteriocina sin

encapsular para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne, prolongando el período de inhibición con respecto al tratamiento con NIS libre.

A continuación, se estudió la formación de películas de CS con la incorporación de las nanopartículas ALG/CS con NIS. La incorporación de NIS encapsulada mejoró las propiedades de las películas, tales como aspecto visual, opacidad, propiedades mecánicas y propiedades térmicas, en comparación a películas conteniendo NIS libre. Sin embargo, estas películas no demostraron actividad antibacteriana en los ensayos de difusión en agar realizados. Como alternativa, se estudió el agregado de CMCS a películas de quitosano con NIS y se encontró que las películas compuestas presentaron una actividad antibacteriana superior a la de las películas de CS con NIS. Además, la incorporación de CMCS tuvo un efecto plastificante y mejoró la distribución de la bacteriocina en la matriz biopolimérica, mejorando las propiedades estructurales. Por último, se comprobó que las películas compuestas conservaron su integridad al envolver trozos de carne luego de 3 semanas a 4 °C.

En suma, en este trabajo se logró desarrollar nuevas alternativas para la mejora de la vida útil e inocuidad de alimentos, en particular de carne vacuna. Entre ellas, se destaca el desarrollo de nanopartículas de ALG/CS con NIS, que demostraron actividad antibacteriana tanto *in vitro* como en carne vacuna, así como el desarrollo de películas de CS/CMCS con NIS, las cuales exhibieron propiedades promisorias para aplicaciones de envasado de alimentos.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Envases biopoliméricos

1.1.1 Antecedentes

Los cambios en el estilo de vida y hábitos alimentarios han impulsado una creciente demanda de alimentos de conveniencia y junto a eso, el crecimiento del mercado global de envases alimentarios. Según un informe de Grand View Research, Inc., se espera que dicho mercado alcance los USD 411.3 billones en el año 2025 (1).

Sin embargo, el desarrollo de envases alimentarios derivados del petróleo ha acarreado un incremento en los residuos plásticos no degradables, con un impacto negativo en el medioambiente. Es así que en las últimas décadas se han comenzado a considerar diversos aspectos en el desarrollo de envases, como ser el compromiso existente entre la funcionalidad del envase y los costos de energía y materiales, la responsabilidad social y ambiental, las regulaciones de desecho de residuos y de sustancias contaminantes, entre otros (2). Como consecuencia, existe un interés cada vez mayor tanto en el desarrollo de tecnologías innovadoras como en el de compuestos naturales que sean capaces de reducir la actual dependencia con los combustibles fósiles y que permitan avanzar hacia el uso de materiales sostenibles (3).

La utilización de biopolímeros en la fabricación de envases biodegradables ha sido ampliamente explorada en los últimos años. De hecho, en 2011 se produjeron 3.5 billones de toneladas de biopolímeros a nivel mundial y se espera que en 2020 se alcance una producción de 12 billones de toneladas (4). En particular, existe una creciente tendencia al desarrollo de tecnologías y productos amigables con el medioambiente y en ese marco, la industria alimentaria presenta un gran interés en el desarrollo de envases que permitan asegurar la inocuidad de alimentos (5).

1.1.2 Biopolímeros

Según la Organización Europea de Bioplásticos, los bioplásticos pueden ser definidos como plásticos fabricados a partir de recursos renovables (biobasados) o como plásticos que son biodegradables y/o compostables (5). Se entiende por polímeros biodegradables a aquellos capaces de descomponerse en CO_2 , CH_4 , H_2O , compuestos inorgánicos o biomasa mediante (principalmente) la acción enzimática de microorganismos. Algunos de estos polímeros pueden ser compostables, implicando que su descomposición sucede a una velocidad consistente con la de materiales compostables conocidos (5). Bajo condiciones adecuadas de humedad, temperatura y disponibilidad de oxígeno, la biodegradación conduce a la fragmentación o desintegración de los plásticos, sin dejar residuos tóxicos o nocivos para el medio ambiente (3).

De acuerdo a su origen, los biopolímeros pueden clasificarse en:

- Polímeros naturales, ya sean extraídos de materias primas naturales como el almidón, celulosa, proteínas, o polímeros producidos por microorganismos (polihidroxialcanoatos, polihidroxibutiratos)
- polímeros sintetizados químicamente a partir de monómeros bioderivados (ácido poliláctico (PLA)) (3,6)

Los biopolímeros representan una alternativa interesante como materiales para envases biodegradables debido a sus propiedades únicas: son biocompatibles, no son tóxicos y no requieren el uso de disolventes orgánicos (7).

1.1.3 Películas biopoliméricas

En términos generales, la función de los materiales de envasado consiste en proporcionar propiedades de barrera para proteger los alimentos del medio ambiente y ayudar a contener el producto alimenticio para su transporte y distribución.

Las películas y recubrimientos comestibles son materiales producidos generalmente a partir de biopolímeros comestibles y aditivos de grado alimentario o “Generally Recognized As Safe”

(GRAS, por sus siglas en inglés). Los envases comestibles son de amplio interés para la industria alimentaria ya que pueden mejorar la calidad de los alimentos, protegiéndolos del deterioro físico, químico y biológico, extendiendo su vida útil y garantizando su inocuidad (8).

Generalmente, los materiales de base utilizados para fabricar películas y recubrimientos comestibles son los biopolímeros (hidrocoloides: proteínas y polisacáridos). También pueden utilizarse lípidos (ácidos grasos, cera), aunque éstos no son considerados biopolímeros. Estos materiales pueden ser utilizados solos o de manera combinada, dando lugar a la formación de matrices compuestas (8).

Las películas suelen estar constituidas por polímeros que son capaces de proporcionar resistencia mecánica a una estructura delgada independiente y preformada, con la que se envuelve al alimento. Por otra parte, los recubrimientos son aplicados directamente a la superficie de los materiales, en asociación directa y continua con el alimento hasta su consumo, por lo que son considerados parte del producto final. Por lo tanto, el requisito fundamental para formular películas comestibles es utilizar al menos un componente capaz de formar una matriz continua con suficiente cohesión (8).

Los polisacáridos y las proteínas presentan propiedades funcionales idóneas para la formación de películas debido a que pueden formar redes moleculares cohesionadas por una alta interacción entre sus moléculas (9). La formación de películas biopoliméricas involucra la interacción intermolecular de los biopolímeros que la conforman, a través de enlaces covalentes (enlaces disulfuro, reticulación química) y/o interacciones no covalentes (electrostáticas, hidrofóbicas) (8).

Dentro de los polisacáridos utilizados para preparar biopelículas (películas biopoliméricas) se incluyen a la metilcelulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, almidón de maíz, almidones modificados, amilosa, hidroxipropil amilosa, ALG, carragenano, pectina, CS, goma gellan, goma xantana, entre otros. Con respecto a las proteínas, se han reportado sistemas que incluyen proteínas del lactosuero, caseínas, colágeno, gelatina, ovoalbúmina, queratina, proteínas de pescado, proteína miofibrilar, zeína de maíz, gluten de

trigo, proteína de soja, proteína de guisante, proteína de maní, proteína de semilla de algodón, proteína del salvado de arroz, entre otras.

Sin embargo, las estructuras de las películas que contienen polisacáridos y proteínas pueden ser quebradizas y rígidas debido a las extensas interacciones entre las moléculas de polímero. Por lo tanto, muchas veces es necesario agregar plastificantes para mejorar las propiedades mecánicas de la película. Los plastificantes son agentes de bajo peso molecular que al ser incorporados al material polimérico, se posicionan entre las moléculas de polímero e interfieren con las interacciones polímero-polímero, aumentando así la flexibilidad y extensibilidad del material (8). El plastificante más utilizado es el glicerol debido a su alta eficiencia y estabilidad, así como a su buena compatibilidad con las cadenas poliméricas de naturaleza hidrofílica (10).

1.1.4 Películas antimicrobianas

Los envases activos son aquellos materiales que, además de proporcionar las propiedades de barrera tradicionales, brindan otras funcionalidades. Estos materiales de envasado pueden interactuar de forma activa con los alimentos o el medio ambiente para mejorar la vida útil de los alimentos (11). Una característica interesante de las películas biopoliméricas es que las mismas pueden contener diversos aditivos para mejorar su efectividad, reducir la acción de microorganismos patógenos y de deterioro y retardar la oxidación y descoloración. Estos aditivos pueden ser agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutraceuticos, colorantes, aromatizantes, nutrientes y aceites esenciales (8).

La principal causa del deterioro de varios alimentos es el crecimiento microbiano en la superficie del producto. La incorporación de agentes antimicrobianos a los envases puede generar un entorno dentro del paquete que retrase o incluso impida el crecimiento de microorganismos en la superficie del alimento, y que por lo tanto prolongue la vida útil y/o mejore la inocuidad del producto (6). Si bien los envases activos con agentes antimicrobianos pretenden mejorar las medidas de calidad utilizadas por la industria alimentaria, no son un sustituto de las buenas prácticas de manufactura y manejo, sino un obstáculo adicional para los microorganismos (12).

Para controlar los microorganismos no deseados en los alimentos durante el almacenamiento y distribución, las sustancias antimicrobianas pueden ser incorporadas tanto al envase como ser utilizadas para recubrir la superficie de los alimentos (6). Los agentes antimicrobianos incorporados en películas o recubrimientos comestibles son liberados en la superficie de los alimentos para reducir, inhibir o retrasar el crecimiento microbiano. Además, también pueden servir como una barrera para la humedad y el oxígeno (6).

En la **Tabla 1**, se observan diversas películas comestibles con propiedades antimicrobianas que han sido aplicadas a distintos alimentos.

Tabla 1. Aplicaciones de películas biopoliméricas con agentes antimicrobianos en distintos alimentos.

Biopolímeros	Agentes antimicrobianos	Alimento	Ref.
CS/gelatina	Aceite esencial de menta y tomillo	Rábano	(13)
ALG	Lactato de sodio, diacetato de sodio	Pescado	(14)
Carboximetil celulosa/polivinil alcohol	Aceite esencial de clavo	Pollo	(15)
CS/gelatina	Extracto de semilla de uva	Pescado	(16)
ALG	Enterocinas	Jamón cocido	(17)
Celulosa	NIS	Carne procesada	(18)
Aislado de proteína de suero	Aceite esencial de orégano	Carne vacuna	(19)
Galactomanano	NIS	Queso ricota	(20)
Proteína de cebada y gelatina	Extracto de semilla de uva	Pescado	(21)
ALG/calcio	Canela, NIS, EDTA	Pescado	(22)
ALG/ κ -carrageenano, pectina, goma xantana y almidón	NIS, lactato de sodio, diacetato de sodio, sorbato de potasio	Pavo	(23)
Caseinato de sodio	NIS	Queso	(24)
ALG	NIS	Carne vacuna	(25)
Caseinato de sodio	NIS	Queso	(26)

En los últimos años, se ha incrementado la demanda de productos naturales frente a la de productos sintéticos, así como de alimentos mínimamente procesados, sin el agregado de conservantes, pero con una vida útil más extensa. Por estos motivos, los agentes antimicrobianos de origen natural han cobrado importancia para su aplicación en envases con propiedades antimicrobianas. Dichos compuestos incluyen a sustancias de origen biológico como ser enzimas

(lisozima, naringinasa), extractos vegetales (aceites esenciales de orégano, ajo, tomillo, clavo, canela) y bacteriocinas (NIS, pediocina, enterocina, lactocina) (12).

1.1.5 Películas bionanocompuestas

La nanotecnología de polímeros es un área interdisciplinaria de investigación, desarrollo y actividad industrial que puede aportar soluciones innovadoras para mejorar las propiedades de los biopolímeros utilizados para el envasado de alimentos. De hecho, la nanotecnología de biopolímeros puede abordar e incluso ampliar las principales funciones del envasado de alimentos (contención, protección, preservación, comercialización y comunicación), proporcionando nuevos materiales compuestos (11).

Un material compuesto resulta de la combinación física de dos (o más) fases químicamente distintas en una escala microscópica, separadas por una interfaz. En los materiales poliméricos nanocompuestos, una de las fases es la matriz polimérica, que rodea a la fase dispersa nanoestructurada (27). Los materiales poliméricos nanocompuestos pueden ser clasificados según la función que cumpla la incorporación de las nanopartículas a la matriz biopolimérica:

- Materiales nanocompuestos “mejorados”: Incorporación de nanopartículas para mejorar las propiedades mecánicas, propiedades de barrera a los gases y estabilidad frente a temperatura o humedad
- Materiales nanocompuestos “activos”: Incorporación de nanopartículas que permite que el envase interactúe con el alimento y con el medio ambiente, desempeñando un papel dinámico en la conservación del producto
- Materiales nanocompuestos “inteligentes”: Incorporación de nanodispositivos a la matriz polimérica que permiten controlar y monitorear el estado del alimento envasado o del medio ambiente que lo rodea durante el transporte y almacenamiento (11)

Las matrices nanocompuestas con propiedades antimicrobianas son consideradas como materiales “activos”, ya que contienen agentes antimicrobianos de tamaño nanométrico. La alta relación de área superficial/volumen y la mayor reactividad de la superficie de dichos agentes

permiten que esos sistemas sean capaces de inactivar más células microbianas en comparación a sus equivalentes de mayor escala (27).

Los agentes antimicrobianos nanoestructurados más utilizados en envases alimentarios comprenden a las nanopartículas metálicas, como ser las de plata, oro, dióxido de titanio, óxido de zinc, óxido de magnesio, entre otras (27). De hecho, las nanopartículas de plata se pueden encontrar actualmente en varias aplicaciones comerciales. Las nanopartículas metálicas actúan por contacto directo, pero también pueden migrar lentamente y reaccionar preferentemente con los ácidos orgánicos presentes en los alimentos (28).

Trabajos más recientes han investigado la incorporación de nanopartículas y nanoemulsiones preparadas a partir de hidrocoloides alimentarios a matrices biopoliméricas. Entre dichos sistemas, se destacan la incorporación de nanoemulsiones conteniendo aceites esenciales y de nanopartículas de CS, mientras que las matrices más comúnmente utilizadas son de biopolímeros como ser CS, gelatina, caseinato y ALG (29–48).

1.2 Quitosano

1.2.1 Características

El CS es un derivado de la quitina (poli (β -(1-4)-*N*-acetil-D-glucosamina)), un polisacárido natural que se encuentra principalmente formando microfibras cristalinas y ordenadas del exoesqueleto de artrópodos o de la pared celular de hongos y levaduras (49). El CS se obtiene a partir de la *N*-desacetilación parcial de la quitina y junto con su precursor, son materiales de gran interés comercial debido al alto porcentaje de nitrógeno que contienen (6.89%) en comparación a la celulosa sustituida sintéticamente (1.25%) (**Figura 1**). Tanto la quitina como el CS presentan excelentes propiedades en términos de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no-toxicidad, propiedades de adsorción, entre otras, por lo que ambos polímeros naturales son ampliamente utilizados como materiales funcionales (50).

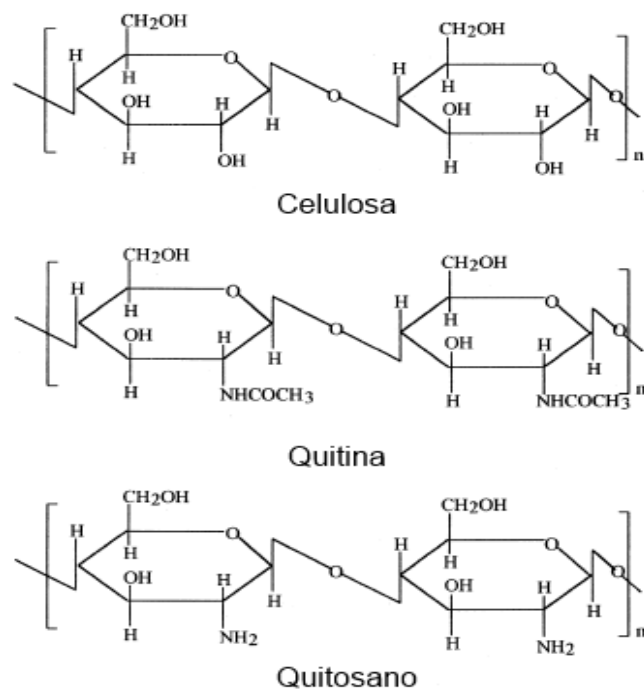


Figura 1. Estructura química de celulosa, quitina y CS (50).

El CS es un copolímero compuesto por unidades de β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, comprendiendo una serie de polímeros que varían en cuanto a su peso molecular (desde aproximadamente 10000 a 1 millón de Da), con grado de desacetilación entre 50 y 95% (51).

Si bien la mayoría de los polisacáridos de origen natural tales como la pectina, dextrina, agar, agarosa y celulosa, entre otras, son de naturaleza neutra o ácida, el CS es un polisacárido básico, soluble en soluciones ácidas diluidas (52). La presencia de grupos amino hace que el CS sea un polisacárido hidrofílico con carga positiva ($pK_a = 6.0-6.5$). Cuando el CS se encuentra en un medio con pH inferior a su pK_a , sus grupos aminos se encuentran protonados (NH_3^+), convirtiéndose en un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por el contrario, si el pH es mayor a 6, los grupos amino del CS se desprotonan por lo que el polímero pierde las cargas y se vuelve insoluble (53).

La presencia de carga positivas permite la interacción del CS con otras moléculas polianiónicas, como ser proteínas, ADN, fosfolípidos u otros polisacáridos. Además, los grupos amino se prestan para una fácil funcionalización de la molécula de CS, ampliando aún más sus aplicaciones. En

efecto, el CS es un material funcional interesante ya que presenta diversas propiedades tales como su mucoadhesividad, capacidad de formación de complejos de polielectrolitos (PECs por sus siglas en inglés), capacidad de formación de biopelículas, quelante de metales, entre otras (52). Asimismo, el CS resulta de interés por presentar también actividad antibacteriana y antifúngica (50,54). Debido a estas razones, el CS se ha aplicado en una amplia gama de áreas incluyendo a la biotecnología, biomedicina, alimentaria, cosmética, farmacéutica, agrícola y en el tratamiento de efluentes (55).

En la industria alimentaria, el CS ha sido investigado para producir películas y recubrimientos con actividad antimicrobiana, como agente clarificador en jugo de manzana, antioxidante en salchichas e inhibidor de pardeamiento enzimático en jugos (55). De hecho, el CS está aprobado como aditivo alimentario en varios países incluyendo a Italia, Finlandia, Corea y Japón. Además, se introdujo en la Farmacopea Europea y en el Formulario nacional de los Estados Unidos en 2008 y 2011, respectivamente (56). Sin embargo, su solubilidad en medio ácido limita la aplicación del CS como agente antimicrobiano ya que su bajo pH puede favorecer reacciones no deseadas en los alimentos, como ser cambios de color y sabor (57).

1.2.2 Nanopartículas de quitosano

El CS es un material que puede ser fácilmente procesado para producir nanomateriales tales como hidrogeles, membranas, nanofibras, micro y nanopartículas, esferas y andamios de regeneración tisular. Dichos materiales permiten la utilización de CS en aplicaciones de reparación tisular, vehiculización de drogas y compuestos activos, biosensores, entre otras (52).

La obtención de partículas de CS mediante gelación iónica fue reportada por Calvo *et al.* (58) en el año 1996 y ha sido ampliamente estudiada desde entonces. La formación de micro o nanopartículas mediante el método de gelación o reticulación iónica tiene lugar debido a las interacciones electrostáticas que se establecen entre las cadenas de CS cargadas positivamente (grupo amino protonado, NH_3^+) y los polianiones provenientes de un agente reticulante (58–60). Las condiciones de reacción para obtener micro o nanopartículas mediante gelación iónica son

relativamente moderadas y los agentes reticulantes pueden ser tanto sintéticos como naturales, siendo el más utilizado el tripolifosfato pentasódico (TPP) (**Figura 2**) (52,61).

Varios trabajos han demostrado que la formación espontánea de nanopartículas de CS/TPP tiene lugar únicamente en determinados rangos de concentración de CS y TPP. Además, se ha observado que el tamaño de partícula depende de las concentraciones de CS y TPP, aumentando cuando una de estas concentraciones aumenta. Cuando la concentración de CS es mayor, las interacciones intermoleculares entre las cadenas de CS son más fuertes que la repulsión electrostática causada por la protonación de los grupos amino, resultando en partículas de mayor tamaño. Por otra parte, una mayor concentración de TPP implica una mayor densidad de grupos cargados negativamente que pueden interactuar con los grupos NH_3^+ del CS. De esta manera, disminuye el potencial zeta de las partículas y por tanto la repulsión electrostática es menor y las partículas forman aglomerados de mayor tamaño cuando se excede el nivel de reticulado óptimo (58,60,62). Por esta razón, varios trabajos han estudiado el efecto de factores tales como la relación de concentraciones, volumen inicial y masa de CS y TPP para trabajar en el rango de adecuado para obtener nanopartículas de CS/TPP.

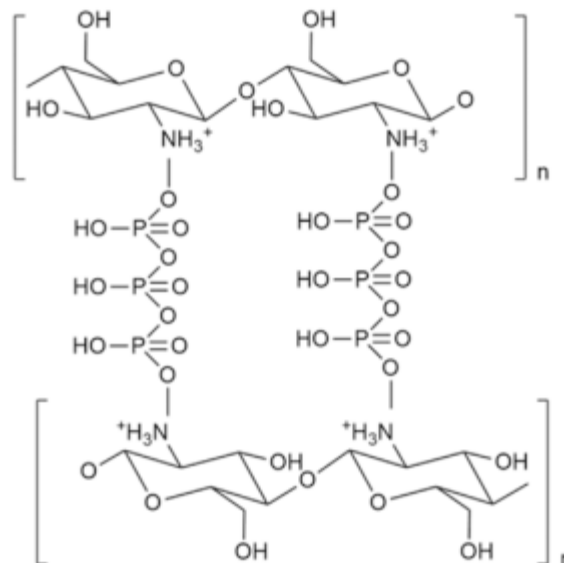


Figura 2. Estructura de nanopartículas de CS reticuladas con TPP (55).

Calvo *et al.* también demostraron que las nanopartículas obtenidas podían ser utilizadas como sistemas de encapsulación de proteínas, encapsulando como proteína modelo a la albúmina de suero bovino (BSA) (58). En estudios posteriores, se encontró que las características de las nanopartículas de CS y su capacidad de encapsulación dependen de varios factores, como ser pH, fuerza iónica, densidad y distribución de cargas, peso molecular y grado de desacetilación del CS, así como la relación y la concentración del biopolímero, agente reticulante y compuesto a encapsular (51,58,60,63–67). Asimismo, se demostró que en los sistemas de encapsulación de proteínas conformados por CS/TPP, los mecanismos responsables de la asociación CS/proteína involucran interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y otras interacciones fisicoquímicas, así como el propio confinamiento físico causado por la gelación controlada del CS (68).

1.2.3 Biopelículas de quitosano

Las películas de CS representan una alternativa interesante como materiales para envases activos, no sólo por sus propiedades inherentes a los biopolímeros, sino también por sus propiedades antimicrobianas, de barrera y su capacidad de quelar metales bivalentes (8,54).

En términos generales, la estructura lineal del CS hace que sus películas sean resistentes, flexibles y transparentes. Las películas de CS puro son generalmente cohesivas, compactas, con superficies lisas, sin poros ni grietas. Al igual que otros polisacáridos, las películas de CS tienden a presentar resistencia a la grasa y aceite, con permeabilidad selectiva a los gases (CO₂ and O₂). Sin embargo, son estructuras hidrofílicas por lo que ofrecen una baja resistencia a la interacción con moléculas de agua (69,70). Según varios estudios, las propiedades funcionales y mecánicas de las películas a base de CS pueden mejorarse al combinar el CS con otros hidrocoloides tales como pectina, almidón, gelatina, caseinato de sodio, entre otros (71).

El CS ha demostrado su actividad antimicrobiana cuando se utiliza como película sobre varios alimentos, aunque para ciertos productos alimentarios, las películas de CS puro no alcanzan el nivel de control microbiano necesario. En otros casos, el papel del CS es proveer una matriz biopolimérica para la vehiculización y liberación de otros compuestos antimicrobianos tales

como ácidos, sales, aceites esenciales, enzimas, bacteriocinas (70). Varias de estas aplicaciones se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Aplicaciones de películas de CS en alimentos.

Matriz	Agentes antimicrobianos	Microorganismo	Alimento	Ref.
CS	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	Roast beef	(72)
CS	Etil lauril arginato, NIS	<i>Listeria innocua</i>	Carne de pavo	(73)
CS	Nanocelulosa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	Carne picada	(74)
CS/gelatina	Extracto de semilla de uva y aceite esencial <i>Ziziphora clinopodioides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pescado	(16)
CS/gelatina	Aceite esencial de menta y tomillo	<i>Listeria monocytogenes</i>	Rábano	(13)
CS/proteína de suero lácteo	-	Bacterias ácido lácticas y microorganismos mesófilos y psicrófilos	Queso ricotta	(75)
CS	-	Bacterias mesófilas aerobias totales, pseudomonas, bacterias productoras de H ₂ S, bacterias ácido lácticas, enterobacterias y <i>Listeria monocytogenes</i>	Pescado	(76)
CS/ciclodextrina	Carvacrol	Mesófilos, psicrófilos, <i>Pseudomonas spp.</i> , enterobacterias, bacterias ácido lácticas y levaduras y hongos.	Pollo	(77)
CS	Nanoemulsión de aceite esencial de mandarina	<i>Listeria innocua</i>	Porotos verdes	(38)

1.2.4 Carboximetil quitosano

Como se mencionó anteriormente, las aplicaciones del CS pueden verse limitadas debido a su baja solubilidad en agua y en solventes orgánicos (78), en particular en el área alimentaria. Por lo tanto, en ocasiones se requiere utilizar derivados del CS con una mayor solubilidad, los cuales

pueden obtenerse mediante modificaciones químicas que introducen grupos hidrófilos a la molécula del CS (19). Un ejemplo es el CMCS, un derivado anfótero del CS que se obtiene a través de la introducción de grupos carboximetilo en los sitios amino, hidroxilo primario y secundario de las unidades de glucosamina (79). Tal como se observa en la **Figura 3**, existen cuatro variantes del CMCS, cuya obtención depende de las condiciones de reacción y de los reactivos utilizados. Las condiciones de reacción, el grado de carboximetilación y el pH del medio determinan la solubilidad del CMCS, pudiendo ser el mismo soluble en agua (80).

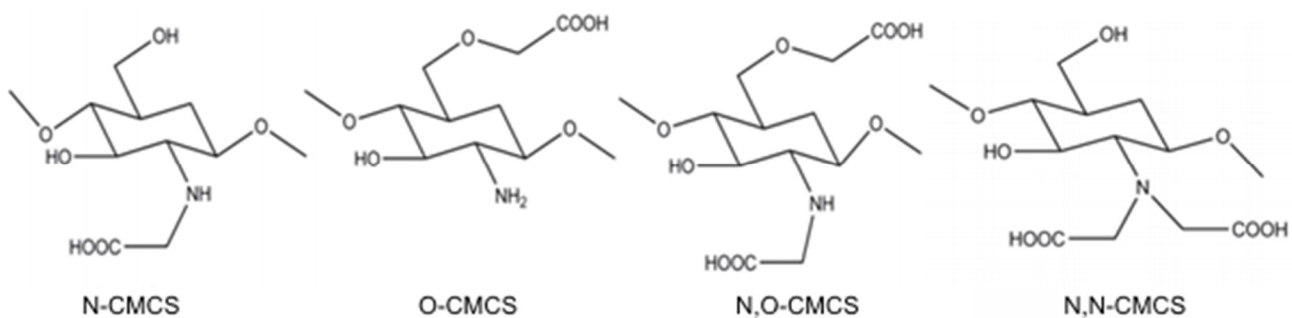


Figura 3. Estructura de los distintos tipos de CMCS (78).

Al igual que el CS, el CMCS es un material biocompatible, biodegradable, con capacidad filmogénica y que puede interactuar con otras sustancias. Este derivado del CS ha sido investigado principalmente en aplicaciones de la industria biomédica y farmacéutica para la vehiculización de drogas y enzimas, reparación de heridas, ingeniería tisular, bioimagenología y cosmética (81). Si bien su uso en el área alimentaria es aún limitada, el CMCS es un biomaterial promisorio para la conservación y envasado de alimentos debido a las propiedades mencionadas previamente (82).

1.2.5 Biopelículas de carboximetil quitosano

El estudio de biopelículas de CMCS se ha orientado principalmente a aplicaciones de liberación controlada de fármacos y aplicaciones biomédicas (83) y en la **Tabla 3** se puede apreciar un resumen de dichas aplicaciones.

Por otra parte, el desarrollo de películas de CMCS para aplicaciones alimentarias es más escaso y más reciente con respecto a otras biopelículas. Suriyatem *et al.* investigaron una biopelícula comestible a partir de CMCS y almidón de arroz (84) y el mismo grupo de trabajo posteriormente incorporó propóleos a dicha matriz biopolimérica para mejorar sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (85). Asimismo, recubrimientos de CMCS fueron estudiados como preservante y agente antifúngico en espárragos verdes (86). Por último, la empresa Nova Chem (Halifax, Canadá) desarrolló un recubrimiento comestible a base de CMCS para preservar frutas (87).

Tabla 3. Biopelículas de CMCS y sus aplicaciones.

Matriz	Fármaco o ingrediente active	Aplicación	Ref.
N/CMCS	-	-	(82,88)
CMCS/PVA	Ác. salicílico, teofilina, ornidazol	Liberación controlada de fármacos	(89)
CMCS/PVA	Ornidazol	Liberación controlada de fármacos	(90)
CS/CMCS	Coenzima A	Liberación controlada de fármacos	(91)
CMCS/ác. hialurónico-carboximetil celulosa	-	-	(92)
O/CMCS	Tetraciclina	Liberación controlada-antimicrobiano	(93)
CS/CMCS	-	-	(94)
CMCS cuaternizado/PVA	Cobre	Antimicrobiano	(95)
CMCS/pululano	-	-	(87)
CMCS	-	Recuperación de heridas	(96)
Almidón de arroz/CMCS	-	Biopelícula comestible	(84)
Almidón de arroz/CMCS	Propóleos	Biopelícula antimicrobiana, antioxidante	(85)
CMCS/polipropilenglicol	-	-	(97)
CMCS/pectina	-	Adsorbente de metales	(98)

1.3 Alginato

1.3.1 Características

El ácido alginico es el principal polisacárido estructural de la pared celular de las algas pardas. Está formado por dos unidades monoméricas de ácido α -L-gulurónico (G) y ácido β -D-manurónico (M), las cuales se agrupan formando bloques con secuencias GG, MM y GM (**Figura 4**). La composición y la secuencia de los residuos G y M dependen de la fuente de las algas e influyen en las propiedades del alginato (ALG) (99).

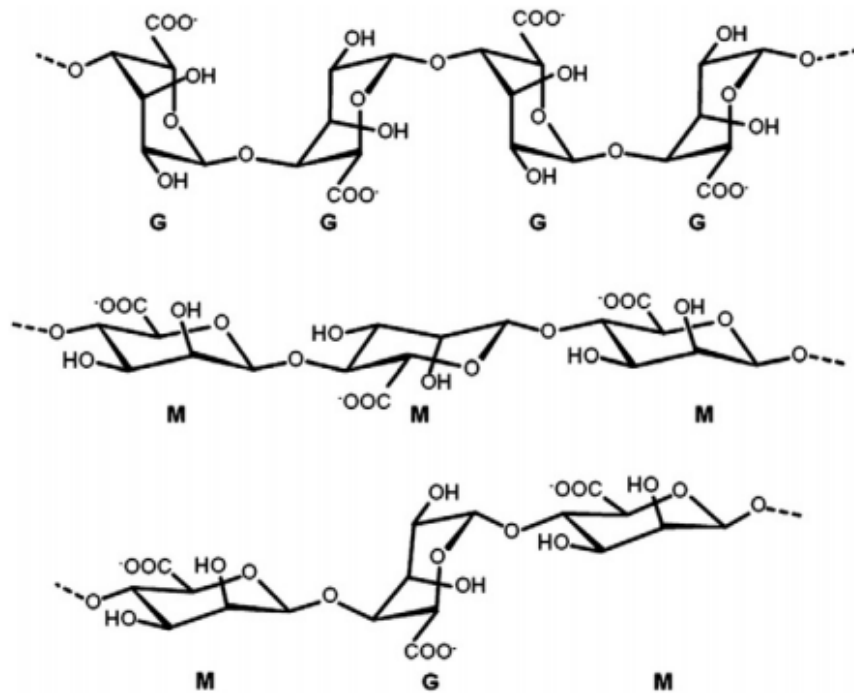


Figura 4. Estructura química de ALGs compuestos por: bloques G, bloques M y G y M intercaladas (99).

El ALG ha sido ampliamente estudiado debido a sus propiedades físicas y químicas, principalmente para la formación de micropartículas y geles. El ALG es un biopolímero aniónico, con valores de pK_a de 3.38 y 3.65 para el ácido manurónico y el ácido gulurónico respectivamente (100). Es una sustancia no tóxica, biodegradable, de bajo costo y fácilmente disponible. Asimismo, el ALG es mucoadhesivo, biocompatible y no inmunogénico (99).

El ALG ha sido utilizado durante muchos años en la industria de alimentos y bebidas como agente espesante, agente gelificante y estabilizador coloidal, y actualmente es un biopolímero con crecientes aplicaciones en la industria de la biotecnología (101).

1.3.2 Micro y nanopartículas de alginato

Las primeras micropartículas de ALG con fines de encapsulación fueron desarrolladas en 1980. Desde entonces, el desarrollo y la aplicación de partículas de ALG han sido ampliamente investigados, siendo dicho biopolímero uno de los materiales más comúnmente aplicados para la formación de micropartículas (hidrogel) en la actualidad (99).

El reticulado químico o físico de las cadenas poliméricas del ALG da lugar a hidrogeles. El método más común para la formación de geles de ALG es mediante la reticulación iónica del ALG con cationes multivalentes, siendo el Ca^{2+} el más utilizado. Dado que este método puede llevarse a cabo en condiciones suaves, es ideal para la encapsulación de principios activos sensibles. La gelación del ALG se basa en el intercambio de iones de Na^+ de los bloques de ácido gulurónico (G) con los cationes multivalentes y el posterior apilamiento de estos bloques G, formando una estructura característica conocida como "caja de huevos". En esa estructura, los iones de Ca^{2+} se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa de los bloques G (**Figura 5**). A su vez, cada cadena puede unirse a otras cadenas, conformando una red tridimensional (99).

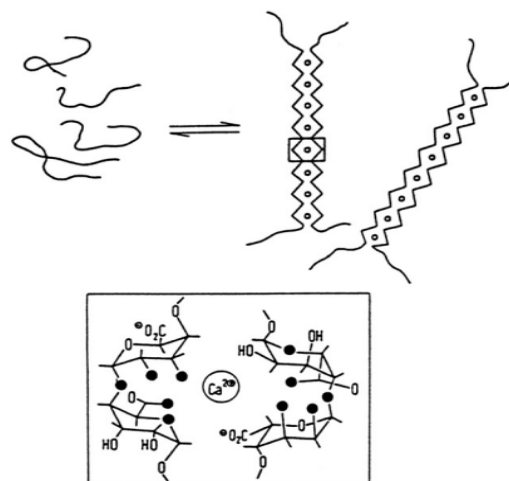


Figura 5. Representación de estructura de "caja de huevos" formada por bloques de ácido gulurónico reticulados por Ca^{2+} (101).

Las propiedades fisicoquímicas de los geles de ALG dependen del tipo de reticulación, la densidad de reticulación, el peso molecular y la composición del ALG, así como de la presencia de agentes complejantes tales como el fosfato y el citrato.

En 1993, Rajaonarivony *et al.* describieron un nuevo método de preparación de nanopartículas de ALG para vehicular fármacos, cuyos tamaños se encontraron entre 250 y 850 nm. Las partículas se formaron al agregar cloruro de calcio a una solución de ALG, con posterior agregado de una solución de poli-L-lisina (102). Dado que las concentraciones de las soluciones de ALG y de cloruro de calcio utilizadas fueron más bajas que las comúnmente utilizadas para formar un típico gel de ALG, se alcanzó un estado de “pre-gel” compuesto por agregados de tamaño nanométrico y dispersos en una fase acuosa continua. A dicho pre-gel se le agregó una solución acuosa de polielectrolito poli-L-lisina, formando así un PEC entre ALG y poli-L-lisina para recubrir a las nanopartículas de ALG formadas previamente (99).

1.3.3 Nanopartículas de alginato/quitosano

La mezcla en solución de polielectrolitos con carga opuesta resulta en la asociación espontánea de los mismos, debido a la formación de interacciones electrostáticas fuertes, aunque reversibles. Estas interacciones directas entre cadenas poliméricas conducen a la formación de redes polielectrolíticas complejas con estructuras no permanentes, en ausencia de agentes reticulantes covalentes.

La formación y estabilidad de los PECs dependen de muchos factores, como el grado de ionización de los polielectrolitos con carga opuesta, la densidad y distribución de las cargas en las cadenas poliméricas, la concentración de los polielectrolitos, su proporción de mezcla, la naturaleza de los grupos iónicos, la posición de los grupos iónicos en las cadenas poliméricas, el peso molecular de los polielectrolitos, la temperatura, la fuerza iónica y pH del medio de reacción, entre otros (61).

Los PECs de ALG/CS han sido objeto de varias investigaciones debido a que ofrecen mejores propiedades en comparación a los biopolímeros por separado, tales como una estructura más

resistente, mayor estabilidad mecánica y menor tendencia a hincharse (100). Además, ciertas características de los PECs de ALG/CS como ser el tamaño de partícula y la carga superficial, pueden ser controladas variando las condiciones de preparación como ser pH, fuerza iónica y composición del medio, así como las características de los biopolímeros utilizados (103).

Los PECs de ALG/CS han cobrado importancia como sistemas para micro y nanoencapsular sustancias activas, actuando de manera sinérgica para proteger a las sustancias encapsuladas de la oxidación, degradación enzimática e hidrólisis (104). Como se observa en la **Figura 6**, la formación de PECs entre ALG y CS ocurre mediante la interacción electrostática entre los grupos NH_3^+ del CS y los grupos COO^- del ALG (105). Los PECs de ALG/CS han sido utilizados principalmente en aplicaciones de administración de compuestos activos tales como la encapsulación de proteínas, péptidos y ADN (106,107).

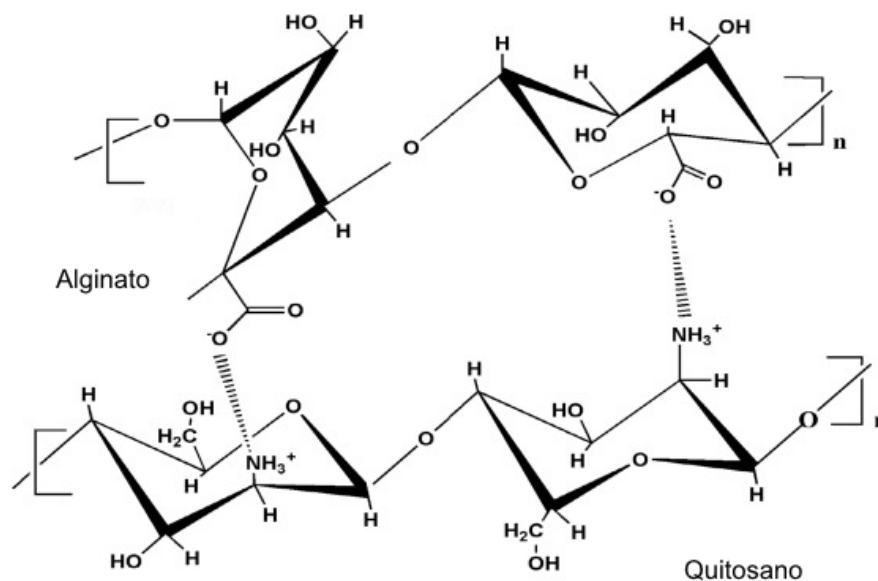


Figura 6. Ilustración esquemática de interacciones electrostáticas entre ALG y CS (105).

Generalmente, la formación de nanopartículas de ALG/CS se basa en el método (modificado) de Rajaonarivony (descrito en 1.3.2), mediante el cual se obtiene un pre-gel de ALG gracias al agregado de cloruro de calcio, el cual es recubierto por CS. En este caso, se forma un PEC entre ALG y CS que se deposita en la interface, y según se ha reportado, esto mejora la estabilidad de las partículas y reduce la porosidad de sus membranas (99). Por otra parte, trabajos más recientes

han reportado la formación de nanopartículas de ALG/CS sin el agregado de cloruro de calcio (105,108).

La aplicación de PECs de ALG/CS en el área alimentaria incluye a la nanoencapsulación de distintas sustancias activas tales como vitamina B₂ (109), aceites esenciales (104,110), ε-polilisina (111), lisozima (112), entre otros. Con respecto a la micro y nanoencapsulación de NIS, Chandrasekar *et al.* estudiaron la formación de micropartículas de ALG/CS conteniendo NIS (113). Por otra parte, Zohri *et al.* reportaron la formación de nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS utilizando únicamente dispersiones coloidales de ALG y CS en presencia de una solución de NIS (114). Estas nanopartículas tuvieron un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* en muestras de leche (114) y contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* en muestras de queso (115).

1.4 Nisina

1.4.1 Características

La fermentación bacteriana de materias primas perecederas ha sido utilizada durante siglos con el fin de extender el tiempo de vida útil y preservar el valor nutricional de alimentos y bebidas. Los productos derivados del metabolismo de las bacterias ácido-lácticas (BAL) incluyen una variedad de compuestos con propiedades antimicrobianas (ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etc.), que actúan como bioconservantes inhibiendo a los microorganismos de deterioro (116). Además de los productos del metabolismo de las BAL, dichas bacterias pueden producir bacteriocinas: péptidos que pueden eliminar o inhibir a las bacterias que compiten por el mismo ambiente o el mismo pool de nutrientes, con una acción más potente que la de los metabolitos mencionados anteriormente. Las bacteriocinas son aisladas de alimentos tales como carne y productos lácteos, ya que normalmente dichos alimentos contienen BAL (116).

La NIS, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, fue descrita por primera vez en 1928 y presenta actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas, incluyendo los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. Es considerada GRAS por la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos y su uso ha sido

aprobado en más de 40 países desde hace más de 50 años como conservante natural de alimentos (116).

La NIS es un péptido pequeño de 34 aminoácidos que pertenece a la familia de los lantibióticos, la cual se caracteriza por contener aminoácidos inusuales tales como lantionina, metil-lantionina, dehidrobutirina y dehidroalanina. A partir de la estructura primaria y terciaria de la NIS, se puede inferir que la molécula tiene un carácter anfifílico. Su extremo N-terminal tiene un número relativamente alto de residuos hidrofóbicos mientras que el C-terminal es más hidrofílico, con grupos funcionales cargados positivamente provenientes de los residuos de lisina e histidina. Otra característica importante de la NIS es la ausencia de residuos con carga negativa, por lo que es un péptido catiónico en un amplio rango de pHs (117) y su punto isoeléctrico (pI) se encuentra a pH 8.8 (118).

El peso molecular de la bacteriocina es de 3510 Da y puede encontrarse formando dímeros o tetrameros. Las principales variantes de la molécula son la NIS A, Z y Q. Las formas A y Z son las más comercializadas y la diferencia entre ambas reside en una única sustitución en la posición 27, ya que la NIS A contiene histidina mientras que la Z contiene asparagina (**Figura 7**) (119).

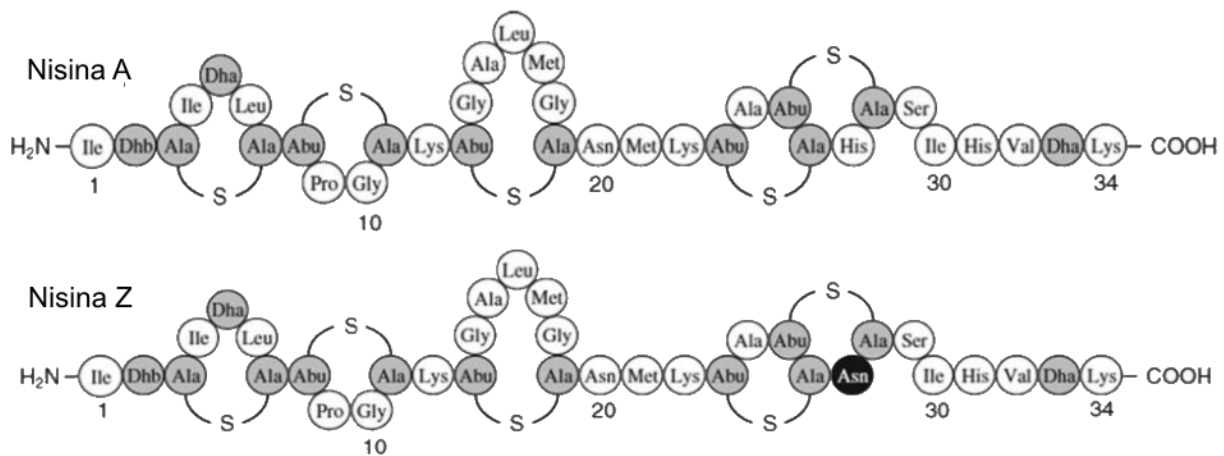


Figura 7. Estructuras de las moléculas de NIS A y Z (119).

El uso de esta bacteriocina como conservante natural en alimentos se debe a que el péptido es fácilmente degradable por las proteasas intestinales, no presenta un riesgo para la salud humana

y no altera las propiedades organolépticas y sensoriales de los alimentos (119). A la hora de aplicar NIS en alimentos, se pueden considerar varias estrategias:

- a) inoculación de alimentos con una cepa productora de NIS
- b) uso de un producto fermentado con una cepa productora de NIS como ingrediente
- c) adición de NIS pura o de preparado semi-puro de NIS como conservante
- d) adición de NIS encapsulada y/o inmovilización de NIS en una matriz sólida (partículas, geles o películas) para controlar su liberación y protegerla de la degradación por enzimas proteolíticas (119)

Los preparados comerciales de NIS que se comercializan actualmente como conservantes naturales para alimentos incluyen a productos tales como Nisaplin® (Danone) y DELVO®Plus (DSM) (116). Dichos preparados se obtienen a partir de la fermentación de leche descremada con *Lactococcus lactis*. El fermento resultante es luego concentrado y separado, secado por spray dryer y molido en pequeñas partículas. El producto final, Nisaplin®, contiene aproximadamente 1×10^6 UI/g de NIS A, 74.4% NaCl, 23.8% de sólidos de leche desnaturalizada y 1.7% de humedad (116).

1.4.2 Actividad antimicrobiana

El mecanismo de acción de la NIS ha sido ampliamente estudiado. En bacterias Gram-positivas, la bacteriocina se ancla a la membrana celular a través de su unión con el lípido II, una molécula precursora del peptidoglucano. Luego se re-orienta y se inserta en la misma, creando un poro transmembrana, el cual permite la salida del material celular, ocasionando la muerte celular de la bacteria. La adsorción inicial de la NIS a la superficie de la célula involucra interacciones electrostáticas entre la bacteriocina catiónica y los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana, mientras que la hidrofobicidad del extremo N-terminal permite su inserción en la membrana celular (120). Debido a la impermeabilidad de su membrana, las bacterias Gram-negativas son generalmente resistentes a la acción de esta bacteriocina (119).

Muchas de las bacterias sensibles a la NIS, tales como *L. monocytogenes* y *Clostridium botulinum* son agentes patógenos. La listeriosis es la enfermedad causada por la bacteria ubicua *L. monocytogenes*, la cual puede crecer a temperaturas de refrigeración y a bajas concentraciones de oxígeno. Si bien la listeriosis es una enfermedad poco común, presenta tasas de mortalidad altas comparadas con las de otros patógenos. Los casos de listeriosis están predominantemente relacionados con el consumo de alimentos refrigerados y listos para el consumo, alimentos crudos o alimentos cocidos que han sido contaminados post-proceso (121). Según la definición del Codex Alimentarius, los alimentos listos para el consumo comprenden cualquier tipo de alimento (incluidas las bebidas) que se consumen normalmente en crudo y cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocinado o transformado de otro modo en un tipo de alimento que se consume normalmente sin elaboración adicional.

Como se aprecia en la **Tabla 4**, la NIS ha sido tradicionalmente empleada en la industria alimentaria como conservante natural en alimentos refrigerados tales como los lácteos (24,114,122–129), las carnes (principalmente vacuna o de cerdo) y sus derivados (25,119,122,130–135). Sin embargo, su aplicación en otras matrices también ha sido estudiada, incluyendo alimentos tales como pescado (22,136,137), carne ovina (138), carne de aves (139,140) y vegetales listos para el consumo (141,142).

Tabla 4. Aplicación de NIS en alimentos (119).

Alimento	Microorganismo	Concentración de NIS efectiva (UI/ml o UI/g)
Queso cottage	<i>L. monocytogenes</i>	2000
Queso ricotta	<i>L. monocytogenes</i>	100
Leche descremada	Esporas de <i>B. cereus</i>	4000
Salchicha tipo bologna	<i>Lb. sake</i> y <i>Lb. curvatus</i>	1000
Queso procesado	<i>Clostridium</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.	200-600
Productos lácteos	<i>Clostridium</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.	10-400
Sopas pasteurizadas	<i>B. cereus</i>	100-250
Bollos	<i>B. cereus</i>	160-250
Alimento enlatado	<i>C. botulinum</i>	100-200
Salsa	LAB	50-250
Cerveza	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	1000-1500

1.4.3 Actividad antibacteriana en carne

En general, la actividad biológica de las bacteriocinas depende de la composición química y de las características físicas de los alimentos a los cuales son incorporadas. En particular, la actividad antimicrobiana de la NIS puede verse disminuida rápidamente luego de la aplicación inicial, debido a mecanismos de difusión física, adsorción y/o degradación química (122). En una matriz cárnica, estos factores incluyen el contenido de sal y grasa, la actividad de agua, la presencia de agentes de curación y otros aditivos, y el tamaño de partícula del alimento. Además, la NIS es relativamente insoluble debido a su carácter hidrofóbico, pierde eficacia a $\text{pH} > 5$ (pH de la carne entre 5.4-5.8) y puede inactivarse en presencia de glutatión (143). La temperatura de almacenamiento, atmósferas modificadas, estado de la carne (cruda o cocida), también pueden afectar la actividad de la NIS (25). Por lo tanto, la NIS es generalmente utilizada en combinación con otros agentes sinérgicos de conservación u obstáculos tecnológicos, como envasada al vacío (122).

Varios estudios han demostrado que la combinación de NIS con otros obstáculos o agentes antimicrobianos aumenta el efecto antibacteriano de la bacteriocina. En particular en carne, Chung *et al.* observaron que el crecimiento de *L. monocytogenes* en muestras de carne magra se retrasó 1 día a temperatura ambiente en comparación con un retraso de 2 semanas cuando se incubó a 5 °C (144). Cutter y Siragusa (145) demostraron que el tratamiento de carne vacuna post rigor con pulverización de NIS condujo a una reducción inmediata de ca. 2 log UFC/cm² para *L. monocytogenes*. Además, estos autores estudiaron los efectos de la combinación de la aplicación de NIS en spray, el envasado en vacío y el almacenamiento a temperaturas de refrigeración, y encontraron que esta combinación de obstáculos inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* durante un período de 4 semanas (132). Solomakos *et al.* investigaron el efecto de NIS y aceite esencial de tomillo en carne picada, y observaron que si bien la NIS mostraba actividad antibacteriana, la inhibición aumentó cuando se combinó NIS con aceite esencial de tomillo, resultando en una disminución de 2 log UFC/g durante el almacenamiento a 4 °C (146). La aplicación simultánea de varias bacteriocinas también fue investigada por Vignolo *et al.*,

encontrando que la mayor actividad antibacteriana se debió a la aplicación de la combinación de NIS junto con una o más bacteriocinas (147).

1.4.4 Nanoencapsulación de nisina

La aplicación de tecnologías en escala nanométrica puede ofrecer una alternativa para facilitar la vehiculización, conservación y liberación controlada de compuestos sensibles, mejorando la eficiencia de los mecanismos involucrados para lograr la encapsulación física, adsorción o conjugación química. Este aumento en la eficiencia se debe a una mayor área específica, así como a mejores condiciones de distribución, liberación y absorción (148).

La encapsulación es el proceso por el cual se atrapan principios activos en un material pared y se basa en la capacidad de dicho material de atrapar moléculas hidrofóbicas o hidrofílicas, según sea necesario. Por su parte, la encapsulación permite evitar la degradación química que resulta de procesos de oxidación o de interacciones con la matriz alimentaria, además de facilitar el aprovechamiento de sinergias entre más de un agente activo (148). Además, generalmente la nanoencapsulación de compuestos activos permite la utilización de una menor cantidad del activo para alcanzar un determinado efecto con respecto a su aplicación sin encapsular (46).

Como se mencionó anteriormente, la aplicación directa de NIS en la superficie de los alimentos puede limitar la efectividad de la acción de la bacteriocina. Es así que la nanoencapsulación de dicha bacteriocina puede constituir una alternativa efectiva para protegerla de la inactivación, evitar interacciones indeseables con los componentes de la matriz alimentaria y de ese modo mejorar su actividad antimicrobiana. Asimismo, la encapsulación de compuestos antimicrobianos puede aumentar su concentración en ciertas áreas de los alimentos en las que los microorganismos están localizados, como por ej., fases ricas en agua o interfaces líquido-sólido (149).

Varios trabajos han investigado la nanoencapsulación de NIS en diversos sistemas, incluyendo liposomas (46,125–127,150–152), partículas formadas por biopolímeros y PECs (7,114,115,153–

158), nanopartículas sintetizadas por precipitación antisolvente (159), nanoemulsiones (160), niosomas (161) y nanofibras (162,163).

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por membranas formadas por bicapas de fosfolípidos, delimitando un espacio hidrofílico entre bicapa y bicapa y un espacio hidrofóbico al interior de la bicapa, por lo que constituyen un vehículo adecuado para encapsular bacteriocinas (164). Los liposomas han sido ampliamente estudiados como sistemas de encapsulación de NIS, pero presentan algunas desventajas como ser el alto costo de los fosfolípidos y del escalado del proceso de producción a nivel industrial (165). Es así que en los últimos años se han investigado otros sistemas para encapsular NIS tales como sistemas biopoliméricos y sus PECs. Entre los sistemas compuestos por un solo biopolímero como material pared, se destacan las nanopartículas de CS (157,166) y ALG (25,167,168). Asimismo, se han reportado varios trabajos que estudiaron la formación de PECs entre dos biopolímeros, incluyendo a PECs de ALG y pectina (156), CS y ALG (114,115,169), ALG y goma guar (170), CS y ácido gamma poli-glutámico (158), ALG y celulosa (171), ALG y almidón resistente (168) y CS y carragenina (169), entre otros.

1.4.5 Incorporación de nisina en películas biopoliméricas

La incorporación directa de NIS sobre la superficie de los alimentos puede ser una estrategia adecuada cuando el crecimiento microbiano se da tanto en la superficie como en el interior de la matriz alimentaria. Sin embargo, la principal causa del deterioro de alimentos es el crecimiento microbiano superficial ocasionado por el procesamiento de los alimentos, por lo que la aplicación directa de NIS implica el agregado de grandes cantidades (sin optimizar) de la bacteriocina para alcanzar la acción antimicrobiana deseada. Una alternativa para superar estas limitaciones es la incorporación de NIS en matrices sólidas tales como biopelículas, para así controlar su liberación y proteger a la bacteriocina de la acción de enzimas proteolíticas. De esta manera, también se puede asegurar una concentración de NIS constante en la superficie del alimento envasado, por lo que se requiere una menor cantidad de la bacteriocina (10).

Varios trabajos han estudiado la incorporación de NIS a distintas matrices biopoliméricas conformadas principalmente por proteínas y polisacáridos, incluyendo recubrimientos y películas

comestibles a partir de celulosa, proteína del lactosuero, proteína de soja, ovoalbúmina, gluten de trigo, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), zeína, CS, ALG, entre otros (18,20,22,24–26,172–188). La incorporación de NIS o de preparados comerciales conteniendo NIS a envases alimentarios puede ser realizada mediante distintas estrategias, que a su vez pueden combinarse. Cuando la NIS se adsorbe o se “deposita” en la superficie de la película, se libera rápidamente, pudiendo ser una limitante para la conservación de alimentos. Por el contrario, cuando la NIS se agrega al seno de la matriz polimérica, su liberación podrá ser controlada y dependerá de las propiedades de los polímeros como ser barrera de difusión o solubilidad, lo que puede prolongar el tiempo de contacto con el alimento (10). En general, las propiedades de la matriz biopolimérica (principalmente la hidrofobicidad) tienen un papel importante en la adsorción o absorción de la NIS. Además, la relación entre la NIS adsorbida o absorbida no siempre es directamente proporcional a la actividad antimicrobiana del envase debido a posibles interacciones NIS-biopolímeros (119).

La incorporación de NIS a distintas matrices poliméricas ha sido estudiada como estrategia para preservar distintos alimentos, entre los cuales se encuentran los productos cárnicos. Tal como se observa en la **Tabla 5**, varios estudios han investigado la actividad antimicrobiana de películas conformadas principalmente por biopolímeros, en diferentes productos cárnicos.

En particular, varios autores han investigado específicamente la acción antibacteriana de envases activos conteniendo NIS. Guerra *et al.* observaron que los envases de celofán activados con NIS en forma de Nisaplin[®], redujeron de manera efectiva (1.5 log) el recuento total de aerobios en carne vacuna luego de 12 días a 4 °C (189). Por su parte, Dawson *et al.* encontraron que biopelículas de proteína de soja conteniendo NIS y aplicadas a la superficie de carne de pavo procesada redujo en 1 log la población de *L. monocytogenes* luego del almacenamiento en refrigeración por más de 21 días (190). En un estudio posterior, McCormick *et al.* estudiaron la aplicación de biopelículas de proteína de trigo conteniendo Nisaplin[®] en carne de pavo procesada, encontrando que su utilización en combinación con un tratamiento térmico de la carne permitió la disminución de la población de *L. monocytogenes* en 2.5 logs durante 8 semanas (191). A su vez, se demostró en un estudio realizado por Nguyen *et al.* que una película de celulosa

con NIS logró reducir en 2 log la población de *L. monocytogenes* en frankfurters, luego de 14 días (18). Por otra parte, Theivendran *et al.* encontraron que recubrimientos a base de proteína de soja, NIS y extracto de semilla de uva o extracto de té verde fueron capaces de reducir en más de 2 log la población de *L. monocytogenes* luego de 28 días tanto a 4 °C como a 10 °C (192). En cuanto a películas plásticas recubiertas con CS y NIS, Ye *et al.* encontraron que películas de CS recubiertas con NIS fueron efectivas a la hora de reducir la carga de *L. monocytogenes* en jamón por 10 días a temperatura ambiente (193). El mismo sistema de envasado fue testeado en salmón ahumado, encontrándose que el recubrimiento de dicha película plástica con una solución de CS conteniendo NIS y otros agentes antimicrobianos, exhibieron una acción antibacteriana frente a *L. monocytogenes* en el salmón almacenado tanto a temperatura ambiente, como a temperatura de refrigeración en combinación con envasado al vacío (194).

Tabla 5. Películas conteniendo NIS para preservación de productos cárnicos.

Matriz	Microorganismo	Aplicación	Ref.
CS/etil lauroil arginato	<i>Listeria innocua</i>	Carne de pavo	(73)
ALG	<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne vacuna	(25)
Celulosa	<i>L. monocytogenes</i> , recuento aerobios total	Frankfurters	(18)
ALG/calico	Recuento viable total, recuento psicotrófico total	Pescado	(22)
Proteína de soja	<i>L. monocytogenes</i>	Frankfurters	(192)
CS/hidroxipropilmetil celulosa (HPMC)-Surlyn®	<i>L. monocytogenes</i>	Jamón	(193)
CS/HPMC/Surlyn®	<i>L. monocytogenes</i>	Salmón	(194)
Celulosa	<i>Listeria innocua</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Jamón	(181)
Polietileno	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Carne vacuna	(195)
Celofán	Recuento aerobios total	Carne vacuna	(189)
Proteína de soja	<i>L. monocytogenes</i>	Carne de pavo procesada	(190)
Proteína de trigo	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Carne de pavo procesada	(191)

1.4.6 Incorporación de nanopartículas de nisina a películas alimentarios

Si bien el agregado de nanopartículas a películas alimentarias representa una alternativa interesante para el desarrollo de envases alimentarios activos de nueva generación, los trabajos que han estudiado la incorporación de nanopartículas de NIS a películas alimentarias son escasos.

El primer trabajo reportado en el cual se fusionó el concepto de película bioactiva con la nanoencapsulación de NIS, fue el de Imran *et al.*, quienes estudiaron el desarrollo de películas de HPMC con incorporación de nanoliposomas de NIS. En dicho estudio, se encontró que las películas nano-activas presentaron propiedades físico-químicas similares a las de las películas de HPMC. Asimismo, los autores propusieron que la incorporación de liposomas de NIS permitió una liberación controlada de la bacteriocina (47).

Un estudio posterior llevado a cabo por Boelter y Brandelli investigó el agregado de liposomas de NIS y nanoarcilla a películas de gelatina y caseinato, los cuales exhibieron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *C. perfringens* y *B. cereus* y según los autores, representaron una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos envases alimentarios (46).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo consistió en el desarrollo de una película biopolimérica para extender la vida útil de productos alimentarios. El biopolímero principal de la película fue el CS y como modelo de principio antimicrobiano se utilizó NIS, el cual fue testeado según su actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes*.

Se plantearon dos estrategias para el desarrollo de las biopelículas con actividad antimicrobiana, las cuales, hasta donde se tiene conocimiento, no han sido reportadas por trabajos previos. La primera consistió en el desarrollo de nanopartículas de CS conteniendo NIS y su posterior incorporación en biopelículas de CS, de manera de conservar las propiedades y controlar la liberación de la NIS. La segunda alternativa consistió en la incorporación directa del principio activo antimicrobiano a películas compuestas de CS y CMCS.

2.2 Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general descrito anteriormente, se plantearon tres objetivos específicos con las siguientes componentes:

- a) **Formulación, síntesis, caracterización y evaluación de nanopartículas conteniendo NIS**
 - i. Puesta a punto de técnica de cuantificación de NIS
 - ii. Desarrollo de formulación y síntesis de nanopartículas en base a CS para encapsulación de NIS
 - iii. Optimización de la formulación mediante herramientas de diseño experimental
 - iv. Ensayos de caracterización de las nanopartículas
 - v. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas *in vitro* y en carne

- b) Formulación, síntesis, caracterización y evaluación de biopelículas a base de CS con incorporación de nanopartículas de CS conteniendo NIS.**
 - i. Síntesis y caracterización de película de CS con incorporación de nanopartículas de NIS
 - ii. Caracterización de película de CS con incorporación de nanopartículas de NIS
 - iii. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las biopelículas

- c) Formulación, síntesis, caracterización y evaluación de biopelículas a base de CS y CMCS conteniendo NIS.**
 - i. Síntesis y caracterización de película de CS y CMCS con incorporación de NIS
 - ii. Caracterización de película de CS y CMCS con incorporación de NIS
 - iii. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de las biopelículas

2.3 Justificación

El presente trabajo de doctorado propuso el desarrollo de recubrimientos biopoliméricos de aplicación alimentaria, como solución alternativa a problemáticas de inocuidad de alimentos, para obtener productos alimentarios de mayor calidad y vida útil. Si bien el estudio y desarrollo de sistemas de envasado comestibles se han consolidado a nivel mundial, la incorporación de nanopartículas con actividad biológica a dichos sistemas es incipiente y por lo tanto se identificó una oportunidad de investigación.

Asimismo, la aplicación de técnicas nanotecnológicas implicó la generación de conocimiento en un área estratégica transversal, en áreas de creciente interés como la inocuidad alimentaria y los envases biopoliméricos, favoreciendo la inserción científica y tecnológica de nuestro país en temas que todavía presentan un gran rezago respecto al contexto mundial.

Por último, cabe mencionar que el trabajo propone alternativas para el desarrollo de estrategias de inocuidad alimentaria, apuntando a su aplicación en carne vacuna, un área de amplio interés nacional. En ese sentido, se seleccionó como microorganismo modelo para la evaluación

antimicrobiana de los sistemas estudiados a *L. monocytogenes* por tratarse de un patógeno relevante en productos cárnicos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Nisaplin[®], la forma comercial más disponible de nisina con 2.5% de nisina pura (1×10^6 UI/g) fue donada por Duey S.A., representante de Danisco Inc. (Grindsted, Dinamarca). El CS con peso molecular viscosimétrico (M_v) de 80.98 kDa y grado de desacetilación (DD) de 81.9% (según lo determinado en Anexo 1) fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El ALG de sodio de grado alimentario fue donado por L&G S.A., representante de Kimika Corp. (Tokio, Japón). El ácido acético (glacial) fue adquirido de Dorwil (Buenos Aires, Argentina). El kit de reactivos de QuantiPro[™] BCA fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). El agua desionizada fue preparada utilizando un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EE.UU.). El N,O-CMCS con M_v de 295.44 kDa, DD de 96.9% y grado de sustitución (DS) de 94.5% (según lo determinado en Anexo 1), fue comprado a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA).

3.2 Cepa bacteriana

Se conservó un cultivo de *Listeria monocytogenes* (ATCC[®] 19111[™]) en tubos de agar de triptona soja (TSA) inclinados, almacenados a 4 °C. Los subcultivos de la fase exponencial de dicha cepa fueron realizados en caldo de triptona soja con extracto de levadura (TSB-YE), ajustando la absorbancia (A_{600}) en un rango entre 0.08-0.10 equivalente al patrón 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml), y se incubaron a 37 °C por 14-16 h, para su utilización en ensayos posteriores.

3.3 Técnicas experimentales

3.3.1 Método del ácido bicinconínico

El método del ácido bicinconínico (BCA) es utilizado para cuantificar proteínas y su aplicación para determinar NIS ha sido ampliamente reportado (47,172,196). Dicho método se basa en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína, con la posterior reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . La cantidad

reducida es proporcional al contenido de proteína. El BCA forma un complejo con el Cu^{1+} de color púrpura intenso con absorbancia máxima a $\lambda = 562 \text{ nm}$.

El ensayo de BCA es más sensible que los ensayos de Biuret o Lowry y presenta una variabilidad menor que la del método de Bradford. Además, el complejo coloreado es estable, es menos susceptible a la acción de detergentes y el método puede ser aplicado en un amplio rango de concentraciones de proteína (172,196,197).

3.3.2 Diseño experimental

En los últimos años, se ha prestado especial atención al diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) para optimizar las condiciones de preparación de los sistemas de nanoencapsulación.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) es una técnica estadística eficiente para la optimización de experimentos con múltiples variables, que permite la determinación de los parámetros óptimos con un bajo número de corridas. La optimización por RSM presenta más ventajas que el enfoque tradicional del estudio de un sólo factor a la vez. Además de consumir más tiempo, los enfoques tradicionales no pueden detectar las interacciones entre distintos factores de un experimento (198).

Los tipos más comunes de modelos RSM son el diseño factorial de tres niveles, el diseño compuesto central y el diseño de Box-Behnken. Este último es más eficiente ya que permite la determinación de los parámetros óptimos con un mínimo de número de corridas con respecto a otros diseños (198).

3.3.3 Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi elástica (QELS, por sus siglas en inglés), se utiliza principalmente para medir el tamaño y su distribución en sistemas coloidales en la región submicrométrica.

Un haz de luz láser pasa a través de una suspensión líquida que contiene partículas en movimiento Browniano. La intensidad del haz de luz disperso fluctúa debido al movimiento aleatorio de las partículas y dichas fluctuaciones, proporcionales al tamaño de las partículas, son medidas a lo largo del tiempo con un determinado ángulo de dispersión. El equipo de DLS genera una función de autocorrelación para determinar el coeficiente de difusión traslacional y luego utiliza la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 1) para determinar el diámetro hidrodinámico:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional, k la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad (199).

3.3.4 Dispersión de luz electroforética

La estabilidad de los sistemas coloidales puede ser estudiada a través de sus propiedades electrocinéticas. Dichas propiedades pueden ser definidas como los fenómenos involucrados en el movimiento tangencial del fluido adyacente a una superficie cargada. Las partículas coloidales adquieren una carga eléctrica superficial al ser suspendidas en un medio polar, como el agua. Estas cargas atraen contra-iones del medio y repelen co-iones, formando una doble capa eléctrica. La doble capa eléctrica tiene dos zonas con propiedades definidas: una primera capa en la cual los iones se encuentran firmemente ligados a la superficie de la partícula (capa rígida), rodeada a su vez por una segunda capa de mayor extensión (capa difusa). Bajo la aplicación de un campo eléctrico externo, la partícula se pone en movimiento y se da una ruptura de la distribución iónica: hay iones que se moverán con la partícula y otros que se quedarán donde se encontraban originalmente. Este límite es conocido como el plano de deslizamiento y el potencial eléctrico en dicho plano es el denominado potencial zeta (200,201).

La teoría DLVO, desarrollada por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek en 1940, relacionó la estabilidad de los sistemas coloidales al balance entre las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica y las fuerzas de atracción de van der Waals. Si las fuerzas de repulsión predominan, las partículas se mantienen separadas evitando la agregación y floculación. Es así que el potencial

zeta, determinado a partir de mediciones de movilidad electroforética, da una indicación sobre la estabilidad coloidal de las partículas en suspensión. Generalmente, las partículas con potencial zetal (valor absoluto) mayor a 30 mV son consideradas estables (202).

3.3.5 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) se basa en la obtención de imágenes mediante la irradiación de un haz de electrones sobre una muestra muy fina. Debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la longitud de onda de la luz visible, las imágenes obtenidas presentan una resolución muy superior a la de las imágenes obtenidas por microscopía óptica. Asimismo, la técnica TEM proporciona información estructural y química sobre un amplio rango de escalas hasta dimensiones atómicas, por lo que su utilización permite comprender las propiedades de los materiales nanoestructurados.

En el modo de funcionamiento estándar de TEM, un haz de electrones incidente penetra a través de una muestra muy delgada. La interacción de los electrones con la muestra resulta en la emisión de electrones no dispersos, electrones dispersados elásticamente y electrones dispersados inelásticamente (203). Sólo una pequeña fracción de los electrones que han pasado a través de la muestra se utiliza para formar la imagen final amplificada, comúnmente denominada imagen de amplitud o de contraste de difracción. Este proceso se realiza a alto vacío, ya que en otro caso los electrones podrían ser desviados por el aire.

En la técnica de microscopía electrónica de alta resolución (HREM, por sus siglas en inglés), se utiliza una apertura del objetivo mucho mayor (o, en ocasiones, ninguna). Así, el haz incidente puede interferir con uno o más haces difractados y el contraste de la imagen dependerá de las fases relativas de los diversos haces. Por lo tanto, este modo de formación de imágenes es denominado imagen de contraste de fase (204).

Los materiales a ser examinados por TEM deben prepararse especialmente, con espesores que permitan transmitir los electrones a través de la muestra, es decir, la muestra debe ser obtenida

o cortada en capas finas. Las muestras que deben ser secadas pueden sufrir alteraciones tales como la pérdida de agua de hidratación y volatilización o reacción de moléculas orgánicas.

3.3.6 Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés), es otra técnica de imagen basada en el escaneo de la superficie de la muestra utilizando una sonda o punta. Aunque este método es relativamente lento y puede requerir una elaborada preparación de muestras, las imágenes son muy similares a las obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) con resolución de hasta varios nanómetros. Además del tamaño y la forma de las partículas, el AFM también puede proporcionar información sobre las propiedades superficiales y topografía de las partículas (199).

3.3.7 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman pertenece a la rama de la espectroscopía vibracional. Cuando un haz de luz monocromática incide sobre una molécula, si bien la gran mayoría de los fotones dispersados sufren una dispersión elástica (dispersión de Rayleigh), una pequeña proporción son dispersados inelásticamente (dispersión Raman). Los fotones dispersados por el efecto Raman experimentan ligeros cambios de frecuencia que son característicos de los enlaces químicos de los componentes. Los espectros Raman son complementarios, aunque intrínsecamente diferentes de, aquellos obtenidos por espectroscopía IR medio (205).

La espectroscopía Raman tiene como ventajas que el análisis se realiza directamente sobre la muestra, sin tratamientos previos, por lo que es una técnica no destructiva. Además, ya que el efecto Raman es poco sensible a las moléculas de agua, es posible caracterizar muestras hidratadas. En particular, mediante la espectroscopía Raman confocal (microscopio confocal acoplado al espectrómetro Raman) es posible obtener espectros Raman puntuales o realizar un barrido tomando varios espectros sobre la superficie de la muestra. Se obtienen imágenes ópticas con los espectros Raman permitiendo estudiar la composición química y su distribución a lo largo de la superficie de la muestra.

3.3.8 Síntesis de películas biopoliméricas

Las biopelículas pueden obtenerse por dos métodos de síntesis: el método húmedo y el método seco. El proceso húmedo, también llamado “casting” de solución o vaciado en placa, se basa en la dispersión o solubilización de los biopolímeros (mediante la preparación de una “solución formadora de película”) y su posterior evaporación, dando lugar a la formación de la biopelícula. Por el contrario, el método seco incluye la utilización de prensado térmico o moldeado por compresión, así como de técnicas de fusión y extrusión (206). Si bien el método seco es más rápido y puede requerir menos energía, el método húmedo puede ser más efectivo y de menor costo.

3.3.9 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), utiliza haces de electrones acelerados y lentes electrostáticas o electromagnéticas para generar imágenes de alta resolución, debido a la corta longitud de onda de los electrones en comparación a la de fotones de luz visible. Es un método utilizado para obtener imágenes de la superficie de la muestra, en el cual el haz de electrones incidente realiza un barrido sobre la superficie de la muestra e interacciona con la muestra para generar señales que reflejan la composición atómica y detalles topográficos de la muestra. Al interactuar con la muestra, el haz de electrones incidente genera emisiones de electrones dispersados elásticamente, (electrones retrodifundidos), electrones de baja energía dispersados inelásticamente (electrones secundarios) y radiación X característica proveniente de los átomos en la superficie o cercanos a la superficie de la muestra. La emisión de electrones secundarios es la predominante en SEM y son los que dan lugar a la formación de la imagen. Para evitar que los electrones colisionen con las moléculas de aire, la muestra es colocada en un receptáculo a alto vacío.

Esta técnica permite la obtención de información de nanomateriales tal como el tamaño, la distribución de tamaño, la forma y la topografía. Sin embargo, el proceso de secado y contraste de las muestras puede ocasionar que las muestras se encojan y por lo tanto alterar las características del material. Asimismo, las muestras deben ser conductoras para evitar la

acumulación de carga y la generación de imágenes falsas, por lo que frecuentemente se aplica un bañado metálico, como ser oro.

En comparación al TEM, el SEM tiene menor resolución, pero produce imágenes 3D de la superficie de la muestra, mientras que el TEM penetra la muestra y produce imágenes de la estructura interna de la muestra. La profundidad de campo, es decir la porción de la imagen observable de forma nítida, alcanzada por SEM resulta notablemente mayor que la alcanzada por TEM (203).

3.3.10 Propiedades mecánicas de películas biopoliméricas

Las propiedades mecánicas describen como se comporta un material cuando se le aplican fuerzas externas y dado que las películas biopoliméricas pueden ser sometidas a diferentes fuerzas externas durante su utilización, es relevante evaluar las propiedades mecánicas de las mismas.

Las fuerzas externas que se aplican sobre un material se pueden clasificar en fuerzas de tensión, compresión, cortante y torsión. Toda fuerza externa que se aplique sobre un material ocasiona que el mismo se deforme. En el caso de una fuerza en tensión, el material se alarga en el sentido de aplicación de la fuerza, y se acorta en la dirección transversal a la fuerza aplicada. Para estudiar la reacción de los materiales a las fuerzas externas que se les aplican, se utiliza el concepto de esfuerzo.

El esfuerzo (σ) se puede definir como la fuerza aplicada por unidad de área que ocurre cuando dos fuerzas actúan en dirección opuesta a través de los dos extremos de una estructura. El σ_{max} es el máximo esfuerzo que puede soportar la muestra durante un ensayo de tensión. Asimismo, la deformación del material se define como el cambio en la longitud a lo largo de la línea de aplicación de la fuerza (207). La deformación de rotura (ϵ) se determina en el punto en el que la película se rompe durante un ensayo mecánico y se expresa como el porcentaje del cambio de la longitud de la muestra con respecto a la longitud original, por lo que es un indicador de la flexibilidad y la extensibilidad de las películas (208).

3.3.11 Propiedades térmicas de películas biopoliméricas

El análisis térmico abarca al grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura mientras se le somete a un programa de temperatura controlado. Los cambios de temperatura pueden tener diversos efectos sobre la estabilidad térmica de los materiales, ocasionando cambios en algunas de sus propiedades.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), es una técnica de análisis térmico que permite la determinación de la temperatura y del flujo de calor asociados a las transiciones del material analizado, en función del tiempo y de la temperatura. Durante un cambio de temperatura, el equipo de DSC mide la cantidad de calor que libera o absorbe una muestra a partir de la diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia (209).

Las propiedades de los materiales y de las mezclas de polímeros dependen de la química y de las propiedades físicas de los polímeros puros, de la presencia de aditivos, así como del tipo de procesamiento aplicado a los polímeros. Por lo tanto, es posible utilizar DSC como método de caracterización física para estudiar el comportamiento térmico de polímeros puros, copolímeros, mezclas de polímeros y compuestos. Generalmente, se utiliza DSC no isotérmico para la identificación de polímeros básicos puros, así como para la determinación de su pureza y estabilidad. Los polímeros amorfos exhiben una temperatura de transición vítrea y los polímeros semicristalinos pueden poseer temperatura de transición vítrea, temperatura de cristalización y temperatura de fusión. Estas propiedades pueden modificarse frente a la presencia de aditivos o debido al procesamiento aplicado a los polímeros (210).

3.3.12 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) es una herramienta utilizada para analizar e identificar la estructura atómica y molecular de un cristal, mediante la cual un haz incidente de rayos X es dispersado en varias direcciones debido al ordenamiento cristalino. Al medir las

posiciones y las intensidades de dichos haces difractados, un cristalógrafo puede producir una imagen tridimensional de la densidad electrónica en la red cristalina. La densidad electrónica determinada indica las posiciones medias de los átomos en el cristal, proporcionando su estructura cristalina.

Los polímeros pueden ser cristalinos, semicristalinos, microcristalinos o amorfos. La presencia y la cantidad relativa de estas formas dependen de la formulación y procesamiento del polímero, afectando las propiedades mecánicas de los mismos. Las técnicas de XRD han sido ampliamente utilizadas en el análisis de películas biopoliméricas para estudiar las fases cristalinas, la estructura, la textura e incluso propiedades mecánicas (211).

3.3.13 Opacidad de películas biopoliméricas

Las propiedades visuales de una película biopolimérica para envasado de alimentos, como ser su transparencia, tienen un gran impacto en el grado de aceptación por parte del consumidor. Es esencial que los materiales de envasado presenten buenas propiedades ópticas, como transparencia y alto brillo, para satisfacer la demanda de los consumidores para tener una visión clara del producto. La transparencia, el opuesto a opacidad, depende del polímero involucrado y de la forma en la que se procesó la película de envase. La formación de cristales grandes durante la preparación de las biopelículas otorga una apariencia opaca debido a la difracción y a la dispersión de la luz incidente por parte de dichos cristales (212).

3.3.14 Permeabilidad al vapor de agua de películas biopoliméricas

La determinación de las propiedades de barrera de una película biopolimérica es crucial para estimar y predecir la vida útil del producto envasado en la misma. Los requisitos específicos de barrera de un sistema de envasado está relacionado con las características y la aplicación final prevista (213).

Un requisito esencial de las películas utilizadas en envasado de alimentos es su capacidad de prevenir, o por lo menos de reducir, la transferencia de humedad entre el alimento y la atmósfera

circundante o entre dos componentes en un alimento heterogéneo, de manera de prolongar la vida útil del alimento envasado (214).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP, por sus siglas en inglés) es un parámetro importante para evaluar la permeación del vapor de agua a una temperatura dada. Para mantener los alimentos frescos, el valor de WVP debería ser mantenido lo más bajo posible (215). Asimismo, es un parámetro clave para garantizar las cualidades organolépticas de los alimentos y la capacidad de las películas para deshidratarse o rehidratarse (216).

3.3.15 Solubilidad de películas biopoliméricas

La resistencia a la exposición al agua es una propiedad importante de las películas comestibles para uso en envasado y protección de alimentos. La solubilidad de las biopelículas es un indicador de su integridad en medio acuoso y en general, una mayor solubilidad indica una menor resistencia al agua. Además, la solubilidad es un factor importante relacionado con la biodegradabilidad de las películas utilizadas para envasado de alimentos (217).

Una baja solubilidad es una ventaja a la hora de almacenar el producto envasado, especialmente cuando la actividad de agua del alimento es elevada, o cuando la película debe estar en contacto con agua durante el procesamiento del alimento, evitando la exudación de productos frescos o congelados (208). Por otra parte, una alta solubilidad puede ser una ventaja para algunas aplicaciones tales como para la cocción de alimentos recubiertos con películas comestibles (217).

3.4 Procedimiento experimental

3.4.1 Cuantificación de nisina

En el presente trabajo se utilizó el ensayo QuantiPro™ BCA (Sigma-Aldrich), ya que brinda una respuesta lineal a bajas concentraciones (0.5 a 30 µg/ml) y además su uso es recomendado para ensayos en placas multipocillos, permitiendo la cuantificación del péptido en varias muestras de manera simultánea.

Las curvas de calibración fueron realizadas mediante el método de diluciones seriadas, a partir de una solución madre de NIS (Nisaplin®) en agua. Las placas conteniendo las muestras fueron incubadas a 60 °C y se evaluaron dos tiempos de incubación: 30 y 60 min. Luego de alcanzar temperatura ambiente, se realizaron medidas de absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Amersham, Reino Unido) a $\lambda = 560$ nm. Las curvas fueron realizadas por triplicado.

3.4.2 Síntesis de nanopartículas de quitosano/tripolifosfato pentasódico con nisina

En primer lugar se realizaron ensayos para determinar el rango de concentraciones necesarias para asegurar la formación de nanopartículas CS/TPP vacías (sin NIS), indicada por la aparición de una suspensión opalescente (58). Para eso, se estudiaron los efectos de la variación de un sólo factor a la vez:

- relación ácido acético/CS: variación de la concentración de ácido acético entre 1.5 y 3.5 mg/ml
- variación de la relación CS/TPP (v/v) inicial entre 1.8 y 3.6.

Como punto de partida para los ensayos, se fijaron los siguientes parámetros de trabajo de acuerdo a lo recabado en bibliografía:

- Relación CS/TPP (p/p) = 3
- [CS] = 1 mg/ml
- Volumen de solución de CS = 10 ml
- pH de trabajo = 4.8
- Temperatura ambiente
- Velocidad de agitación entre 600 y 800 RPM

Para preparar las nanopartículas, se prepararon soluciones de CS en ácido acético 1% (v/v) y TPP con las concentraciones necesarias para alcanzar las concentraciones planteadas en los ensayos preliminares. En particular, para cada síntesis, se preparó una solución de CS y se dejó en

agitación por 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se ajustó el pH a 4.8 con NaOH. Se agregó gota a gota y con agitación agua (blanco) y se mantuvo en agitación por 90 min. Por último, se agregó gota a gota y con agitación la solución de TPP. Se mantuvo en agitación por 60 min.

Luego de obtenidas las nanopartículas, se estudiaron los efectos de la concentración de ácido acético y de la relación inicial CS/TPP (v/v) sobre su tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés) (según lo descrito en 3.4.6) y potencial zeta (según lo descrito en 3.4.7).

A partir de estos resultados, se establecieron los parámetros (concentración de ácido acético y relación CS/TPP (v/v) inicial) de trabajo y se estudió el efecto de la variación de CS/TPP (p/p) sobre nanopartículas conteniendo NIS. Las nanopartículas se prepararon al igual que las nanopartículas vacías, utilizando una solución de NIS (Nisaplin®) en lugar de agua (blanco). Luego, se analizó el tamaño de partícula, PDI y potencial zeta y por último, se evaluó la eficiencia de encapsulación (según lo descrito en 3.4.5).

3.4.3 Síntesis de nanopartículas de alginato/quitosano con nisina

Las nanopartículas conteniendo NIS fueron preparadas según una modificación del método de preparación de nanopartículas de ALG-poli-L-lisina descrito en 1.3.2 (102). En el presente trabajo, las nanopartículas fueron preparadas por gelación iónica de ALG mediante el agregado de Nisaplin®, seguido de una complejación con CS.

En primer lugar, se prepararon soluciones stock de CS y ALG a 25 °C. Para preparar la solución de CS, se disolvió el biopolímero en ácido acético 1% (v/v) para obtener una concentración de 5 mg/ml, se agitó por 30 min y luego se ajustó el pH a 5.4 utilizando NaOH 1 N. Por otra parte, se disolvió ALG en agua desionizada de manera de alcanzar una concentración de 5 mg/ml, se agitó por 30 min y luego se ajustó el pH a 5.2 utilizando HCl 1 N. Ambas soluciones fueron filtradas con un filtro de jeringa de 0.22 µm y almacenadas a 4 °C hasta su uso. Para obtener las soluciones de trabajo, se diluyeron las soluciones stock de ALG y CS previamente preparadas con agua

desionizada, para alcanzar las concentraciones finales deseadas (114). Por otra parte, las soluciones de Nisaplin® siempre se prepararon frescas, utilizando agua desionizada, previo a cada ensayo.

Para la síntesis de las nanopartículas conteniendo NIS, se agregó gota a gota la solución de Nisaplin® (1 ml) a la solución de ALG (8 ml), en agitación. Se mantuvo en agitación por 30 min. Luego, se agregó gota a gota la solución de CS (4 ml) a la mezcla ALG/NIS y se mantuvo en agitación por 60 min. Todos los pasos involucrados en la preparación de las nanopartículas se llevaron a cabo a 25 °C.

3.4.4 Diseño experimental y optimización de la formulación

Para evaluar y optimizar los parámetros de la formulación de las nanopartículas, se utilizó un diseño experimental de Box-Behnken con 3 factores en 3 niveles. La matriz del diseño experimental y el análisis de los datos fueron realizados utilizando el programa Design-Expert® (Version 10, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.). Las variables independientes estudiadas fueron: el contenido final de ALG (X_1), la relación ALG/CS (p/p), (X_2) y el contenido final de Nisaplin® (X_3). Las variables dependientes consideradas fueron: la eficiencia de encapsulación (Y_1), el tamaño de partícula (Y_2) y el potencial zeta (Y_3).

Tabla 6. Variables independientes y dependientes del diseño experimental de Box-Behnken.

Variables independientes	Niveles		
	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
X_1 = ALG (mg/ml)	0.3	0.5	0.7
X_2 = ALG/CS (p/p)	2	5	8
X_3 = Nisaplin® (mg/ml)	0.8	2	3.2
Variables dependientes	Restricciones		
Y_1 = eficiencia de encapsulación (%)	Maximizar		
Y_2 = tamaño de partícula (nm)	Minimizar		
Y_3 = potencial zeta (mV)	Y_3 >30		

Para seleccionar los rangos de las variables independientes requeridas para la formación de las nanopartículas, se realizaron ensayos preliminares de un factor a la vez utilizando rangos de

concentración final (concentración de ALG de 0.3 a 1 mg/ml, relación ALG/CS (p/p) de 0.5 a 8, concentración de Nisaplin® de 0 a 4.4 mg/ml, seleccionados en base a lo recabado en bibliografía (7,108,114,169,218–220). Las muestras fueron analizadas visualmente y la ausencia de agregación y la formación de una dispersión opalescente indicaron la formación de las nanopartículas. Los rangos de concentración encontrados en dichos ensayos preliminares y que llevaron a la formación de nanopartículas determinaron la región experimental resultante del diseño de Box-Behnken. En la **Tabla 6** se pueden observar los rangos utilizados en el diseño experimental de Box-Behnken para las variables independientes y los factores de respuesta.

La matriz del diseño experimental comprendió 15 corridas experimentales, incluyendo 13 puntos factoriales con tres réplicas en el punto central (**Tabla 7**).

Tabla 7. Diseño experimental de Box-Behnken.

Corrida	Variables independientes		
	X ₁ (mg/ml)	X ₂ (p/p)	X ₃ (mg/ml)
1	0.7	5	3.2
2	0.3	5	0.8
3	0.5	8	0.8
4	0.7	2	2
5	0.5	8	3.2
6	0.5	5	2
7	0.7	5	0.8
8	0.3	8	2
9	0.3	2	2
10	0.5	5	2
11	0.5	5	2
12	0.5	2	0.8
13	0.5	2	3.2
14	0.7	8	2
15	0.3	5	3.2

Las respuestas observadas fueron ajustadas a modelos de primer y segundo orden. Los modelos fueron comparados y evaluados de acuerdo a la significancia estadística de los coeficientes y valores de R² utilizando ANOVA. Para cada factor de respuesta (Y), se definió una ecuación de segundo orden según:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (2)$$

Donde Y es la respuesta medida de las variables dependientes; β_0 es la ordenada en el origen; β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes lineales; β_{11} , β_{22} y β_{33} son los coeficientes cuadráticos; β_{12} , β_{13} y β_{23} son los coeficientes de interacción, y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes. Con el fin de validar los modelos generados, se llevaron a cabo cinco experimentos con los parámetros de la formulación óptima. Para evaluar la precisión de los modelos obtenidos, se compararon las respuestas experimentales con los valores predichos. Asimismo, la aplicación de RSM incluyó la generación de superficies de respuesta 3D y gráficas de contorno para estudiar los efectos principales y las interacciones entre las variables independientes y los factores de respuesta.

La formulación óptima se obtuvo utilizando el programa Design-Expert®, mediante la aplicación de las restricciones descritas anteriormente en la **Tabla 6**. La formulación óptima obtenida fue utilizada a la hora de sintetizar nanopartículas para los ensayos de caracterización y los análisis antimicrobianos.

3.4.5 Eficiencia de encapsulación de nanopartículas

La eficiencia de encapsulación (EE) se define como la relación de NIS encapsulada con respecto a la NIS total incorporada. Se puede determinar de manera indirecta, utilizando la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{(W_t - W_f)}{W_t} \times 100 \quad (3)$$

Donde: W_t = NIS total (g), W_f = NIS libre en sobrenadante (g).

Para la determinación de la EE, se cuantificó la nisina libre en el sobrenadante. Para pelletizar las nanopartículas, se centrifugó 5 ml de suspensión de nanopartículas a 20000 x g durante 40 min a 8 °C. La EE (%) se calculó según la ecuación 3.

3.4.6 Tamaño de partícula

Las medidas de tamaño de partícula y PDI se realizaron utilizando un analizador de tamaño de partícula y potencial zeta (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las medidas se realizaron a 25 °C. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.4.7 Potencial zeta

Las medidas de movilidad electroforética se realizaron utilizando un analizador de tamaño de partícula y potencial zeta (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las medidas se realizaron a 25 °C. Las muestras fueron analizadas por triplicado. Se utilizó el modelo de aproximación de Smoluchowski para obtener el potencial zeta a partir de la movilidad electroforética.

3.4.8 Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de nanopartículas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) utilizando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-STEM JEOL 2100, Jeol, Japón). La suspensión de nanopartículas fue ultrasonificada por 15 min y luego se colocó una gota de la muestra en una grilla de cobre (300-mesh) con film de carbono. Se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Gatan Orius SC 1000, sonda EDS OXFORD X-Max 65T con detector SDD de 65mm² (Gatan Inc., Pleasanton, EE.UU.).

3.4.9 Microscopía de fuerza atómica

Las nanopartículas de NIS se analizaron utilizando un microscopio de fuerza atómica WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania) en el modo AC. Se colocó una gota de suspensión de nanopartículas sobre un sustrato de silicio y la muestra se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente. Los sensores de AFM tuvieron una $k=42$ N/m, frecuencia de resonancia nominal de 285 kHz, largo de 160 μm , ancho promedio de 45 μm y espesor de 4.6 μm . La frecuencia de operación fue de 81.6 kHz.

3.4.10 Espectroscopía Raman

Las mediciones de espectroscopía Raman confocal se llevaron a cabo utilizando un microscopio Raman-Confocal WITec Alpha 300-RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania). Se analizaron muestras de nanopartículas cargadas con nisina y se compararon con soluciones de ALG/CS, NIS, CS y ALG. Las muestras se prepararon con las mismas concentraciones finales que la formulación óptima. Para preparar la muestra de NIS, se disolvió Nisaplin[®] en agua desionizada y se centrifugó a 4000 RPM durante 10 min para eliminar los sólidos insolubles. Se colocó una gota de la muestra correspondiente sobre un sustrato de silicio y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h. Los espectros Raman se obtuvieron utilizando un láser de excitación de $\lambda = 785$ nm y potencia de 10 mW. Se promedió un conjunto de 20 espectros con tiempo de integración de 0.2 s.

3.4.11 Actividad antimicrobiana *in vitro* de nanopartículas

Para todos los estudios de actividad antimicrobiana (*in vitro* y en carne), y con el fin de lograr la concentración de NIS (proveniente de las nanopartículas) requerida en cada instancia, las suspensiones de nanopartículas de ALG/CS con NIS se centrifugaron a $20.000 \times g$ a 8°C por 40 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en agua desionizada. La cantidad de suspensión de nanopartículas requerida para obtener la concentración de NIS equivalente se calculó utilizando la EE experimental de la formulación optimizada.

Con respecto a la actividad antimicrobiana *in vitro*, se realizaron estudios de CMI, CMB e inhibición del crecimiento microbiano a 4°C :

a) CMI y CMB

Se determinó la CMI del sistema planteado con respecto al crecimiento de un inóculo de *L. monocytogenes*, comparando el efecto inhibitorio de muestras de nanopartículas de ALG/CS con NIS con el de soluciones de NIS libre.

Para la determinación del valor de CMI se utilizaron placas multipocillos (**Figura 8**) y en cada pocillo se sembró 100 μl de caldo triptona soja-extracto de levadura (TSB-YE, por sus siglas en

inglés) y 50 µl de TSB-YE inoculado con el cultivo de *L. monocytogenes* (5×10^5 UFC/ml) preparado según lo descrito en 3.2. Además, a cada pocillo se le agregó 50 µl de dispersión de nanopartículas de ALG/CS con NIS o solución de NIS libre (Nisaplin®).

Las concentraciones finales equivalentes de NIS fueron de 125, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 UI/ml, tanto para las muestras de nanopartículas como de NIS libre. Las microplacas se incubaron a 37 °C y se monitoreó el crecimiento microbiano a 0, 24 y 48 h mediante medidas de A_{600} , utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Amersham, Reino Unido).

La inhibición del crecimiento microbiano (%) se calculó según:

$$\text{Inhibición(\%)} = \frac{A_{600\text{control}} - A_{600\text{ muestra}}}{A_{600\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

Los valores de CMB se determinaron a partir de las placas utilizadas para la determinación de la CMI. Luego de 24 y 48 h de incubación a 37 °C, se subcultivó 10 µl de cada pocillo en placas con agar PALCAM y suplemento selectivo PALCAM. Las placas se prepararon por duplicado y se incubaron a 37 °C por 24-48 h. Al finalizar la incubación, se examinó el crecimiento de colonias de *L. monocytogenes* en las placas. La ausencia de crecimiento indicó que el sistema probado tuvo acción bactericida para la dilución contenida en el pocillo correspondiente.

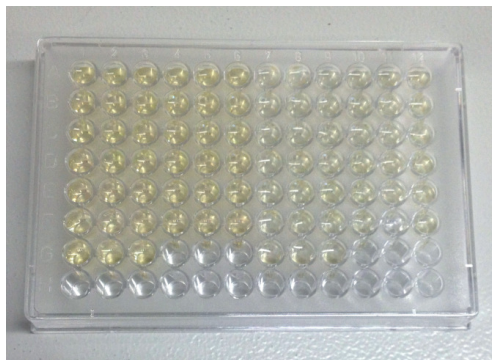


Figura 8. Microplaca para determinación de CMI y CMB.

b) Inhibición del crecimiento microbiano a 4 °C

Para estudiar la inhibición del crecimiento a temperatura de refrigeración, se prepararon microplacas adicionales conteniendo muestras de nanopartículas y NIS libre, tal como se describió previamente, las cuales fueron almacenadas a 4 °C. En los pocillos de control (sin tratamiento) se colocó agua como blanco. Las concentraciones finales de NIS fueron 125, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 UI/ml. Se realizaron medidas de A_{600} a los 0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 27 días para monitorear el crecimiento bacteriano en el tiempo. Los incrementos de absorbancia menores a 0.05 UA entre 0 y 24 h indicaron que la concentración del principio antimicrobiano tuvo un efecto inhibitorio en los pocillos correspondientes (221,222).

3.4.12 Actividad antimicrobiana en carne de nanopartículas

Se cortaron trozos de carne vacuna magra fresca de aproximadamente 10 g. Los trozos fueron sometidos a radiación UV por 15 min en cabina estéril y luego fueron inoculados (mediante aplicación con pipeta) con 0.5 ml de un cultivo de *L. monocytogenes* (preparado según lo descrito en 3.2) de manera de alcanzar $\sim 1 \times 10^4$ UFC/g de carne. Luego de incubación a 25 °C por 15 min para facilitar la adhesión superficial, las muestras fueron colocadas asépticamente en bolsas plásticas Cryovac® T7335B (Sealed Air Corp., Charlotte, NC, USA). A continuación, se aplicaron los siguientes tratamientos:

- a) Solución de NIS de 400 UI/g de carne
- b) Solución de NIS de 800 UI/g de carne
- c) Solución de nanopartículas de ALG/CS con NIS de 400 UI/g de carne
- d) Solución de nanopartículas de ALG/CS con NIS de 800 UI/g de carne
- e) Agua desionizada como solución control (sin tratamiento)

A continuación, se cerraron las bolsas aplicando vacío y se conservaron a 4 °C. Se retiraron muestras a los 0, 4, 10, 17 y 24 días. Cada bolsa retirada fue abierta en cabina estéril y se le agregó 200 ml de buffer Butterfield. El contenido de las bolsas fue homogenizado a 170 RPM por 20 segundos utilizando un equipo Stomacher® 400 Circulator (Seward, Reino Unido). Luego, se

tomaron 100 µl de cada muestra y se sembraron en placas de Petri con medio agar PALCAM y suplemento selectivo PALCAM. Las placas fueron incubadas a 37 °C y se realizó recuento de colonias de *L. monocytogenes* a las 24-48 h.

3.4.13 Preparación de soluciones formadoras de películas de quitosano con nanopartículas

En primer lugar, se prepararon soluciones stock de CS y NIS. Las soluciones stock se prepararon a 25 °C. Para la solución de CS, se disolvió dicho biopolímero en ácido acético 1% (v/v) para obtener una concentración de 2% (p/v). Dicha solución fue mantenida en agitación por 30 min, filtrada con un filtro de jeringa de 0.22 µm y almacenada a 4 °C hasta su uso. Las soluciones de NIS se prepararon frescas antes de cada ensayo, disolviendo Nisaplin® en agua desionizada para alcanzar una concentración de 40000 UI/ml y centrifugando a 4000 RPM por 10 min a 4 °C para remover los sólidos insolubles.

Luego, se prepararon las soluciones formadoras de películas. Para eso, se preparó una solución acuosa de CS 1% (p/v) a partir de la solución stock de CS. Se agregó glicerol como plastificante (0.2 g/g de biopolímero) (94). Por otra parte, se prepararon nanopartículas de ALG/CS siguiendo la formulación óptima encontrada en 4.3.2. Con el fin de lograr la concentración de NIS requerida en cada película (proveniente de las nanopartículas), las suspensiones de nanopartículas de ALG/CS con NIS se centrifugaron a 20.000 x g a 10 °C durante 40 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en agua desionizada. Para calcular la cantidad necesaria de nanopartículas para obtener la concentración equivalente de NIS, se consideró la EE experimental de la formulación óptima. Las suspensiones de nanopartículas (5 ml) se incorporaron gota a gota a 31 ml de la solución de CS 1% (p/v) en agitación (400 RPM). Se continuó agitando por 30 min.

Para las biopelículas de CS con NIS libre, se preparó una solución acuosa de CS 1% (p/v) a partir de la solución stock de CS. Se agregó glicerol como plastificante (0.2 g/g de biopolímero) (94). Por otra parte, se agregó gota a gota y bajo agitación (400 RPM), 5 ml de una dilución de la solución stock de NIS a 31 ml de la solución de CS 1% (p/v), de manera de alcanzar la concentración final

de NIS requerida para cada biopelícula. La solución formadora de película resultante se dejó en agitación por 30 min.

Por último, para las biopelículas de CS control (sin NIS ni nanopartículas de ALG/CS con NIS) se utilizó 5 ml de agua desionizada en lugar de la solución de NIS o de nanopartículas.

3.4.14 Preparación de soluciones formadoras de películas de quitosano y carboximetil quitosano

En primer lugar, se prepararon soluciones stock de CS, CMCS y NIS. Las soluciones stock se prepararon a 25 °C. Para la solución de CS, se disolvió dicho biopolímero en ácido acético 1% (v/v) para obtener una concentración de 2% (p/v). Por otro lado, se disolvió CMCS en agua desionizada para obtener una concentración de 1% (p/v). Ambas soluciones fueron mantenidas en agitación por 30 min, filtradas con un filtro de jeringa de 0.22 µm y almacenadas a 4 °C hasta su uso. Las soluciones de NIS se prepararon frescas antes de cada ensayo, disolviendo Nisaplin® en agua desionizada para alcanzar una concentración de 40000 UI/ml y centrifugando a 4000 RPM por 10 min a 4 °C para remover los sólidos insolubles.

Para preparar las soluciones formadoras de películas, se diluyeron las soluciones stock de CS y CMCS en agua desionizada para alcanzar una concentración de 1% (p/v) y las soluciones obtenidas se dejaron en agitación por 30 min a 25 °C. Luego, se agregó la solución de CMCS gota a gota a la solución de CS en agitación, en las siguientes relaciones CS/CMCS: 100/0, 95/5, 90/10, 85/15 and 80/20 (p/p), con una concentración de biopolímero final de 1% (p/v). Dichas relaciones fueron obtenidas a partir de los ensayos preliminares descritos en el Anexo 2. A continuación, se agregó glicerol como plastificante (0.2 g/g de biopolímero) (94). La mezcla fue dejada en agitación por 14-16 h a 25 °C, se centrifugó a 4000 RPM por 10 min a 25 °C y se recuperó el sobrenadante, obteniéndose así las soluciones de CS/CMCS. Para las películas de CS/CMCS con NIS, se agregó gota a gota 5 ml de una dilución de la solución stock de NIS a 31 ml de la solución CS/CMCS correspondiente, en agitación (400 RPM), de manera de alcanzar concentraciones finales de NIS de 1000 y 6000 UI/ml de solución formadora de películas. Se dejó en agitación por 30 min. Las películas control (sin NIS) se prepararon utilizando agua desionizada.

3.4.15 Síntesis de películas biopoliméricas

Todas las biopelículas se elaboraron por el método de "casting" o vaciado en placa, para lo cual se vertieron 31 ml de la correspondiente solución formadora de película en placas de poliestireno (83 x 125 mm) y se dejaron secar a temperatura ambiente por 48-72 h.

Las biopelículas obtenidas fueron desmoldadas con facilidad y se conservaron en desecador con 50% de humedad relativa. Para alcanzar dicha HR, se colocó una solución acuosa de glicerol (79% (p/p)) en el desecador (223).

3.4.16 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron imágenes SEM para analizar la microestructura de las muestras de biopelículas. Las películas se colocaron en un portamuestras de aluminio con cinta de carbono de doble faz y se metalizaron con oro. Todas las muestras se examinaron y fotografiaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900 Low Vacuum (Jeol Ltd., Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 20 kV.

3.4.17 Determinación del espesor de películas biopoliméricas

El espesor de las películas se midió utilizando un micrómetro de mano (Tactix 245311, Meridian International Co. Ltd, China), al 0.001 mm más cercano. Las medidas se realizaron en al menos siete ubicaciones aleatorias de cada película y los valores se informaron como promedio \pm SD. Los valores se utilizaron para determinar la opacidad, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y las propiedades mecánicas.

3.4.18 Propiedades mecánicas de películas biopoliméricas

Las pruebas de tracción se realizaron con un analizador de textura (TA.XT Plus, Stable Micro System Ltd., Reino Unido) de acuerdo con el método ASTM D882 (224), tal como se observa en la **Figura 9**. Se analizaron tiras de muestras de películas (100 mm x 10 mm). Las medidas se

llevaron a cabo con una separación inicial de agarre de 50 mm y una velocidad constante de 50 mm/min a 25 °C hasta la ruptura.

El σ_{\max} y la ϵ (%) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\sigma_{\max} \text{ (MPa)} = \sigma_{\max} / A \quad (4)$$

$$\epsilon \text{ (\%)} = 100 \times (L - L_0) / L \quad (5)$$

Donde σ_{\max} es la resistencia máxima (N), A es el área de la sección transversal de la película (mm²), L es la longitud final (mm) y L₀ es la longitud inicial (mm) de la probeta. Para cada formulación, se analizaron cinco muestras y los valores se informaron como promedio \pm SD.

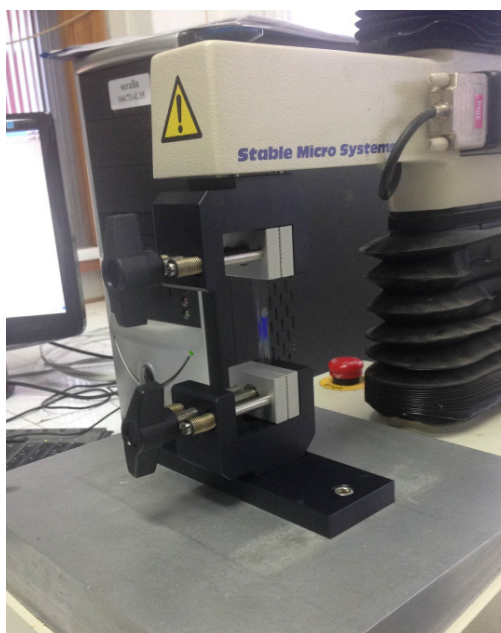


Figura 9. Texturómetro utilizado para determinación de las propiedades mecánicas de las biopelículas mediante ensayos de tracción.

3.4.19 Propiedades térmicas de películas biopoliméricas

Las propiedades térmicas de las películas biopoliméricas se evaluaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC-60, Shimadzu, Japón). Las muestras (5 mg) de películas se pesaron y se colocaron en crisoles de aluminio sin tapas, en atmósfera estática. Como referencia, se utilizó un crisol vacío. Para eliminar la historia térmica y los efectos de la humedad en las muestras, se

realizaron dos ciclos de calentamiento (10 °C/min): primer ciclo de 25 °C a 180 °C, enfriamiento a 25 °C y segundo ciclo de 25 °C a 320 °C. Las curvas se realizaron tomando los valores promedios.

3.4.20 Difracción de rayos X

Las películas se analizaron por XRD utilizando un difractómetro (Ultima IV, Rigaku Co., Japón), con radiación $\text{CuK}\alpha$. Los difractogramas se realizaron en configuración Bragg-Brentano, en un rango de 10 a 50°, en pasos 2θ de 0.02° y tiempo de integración de 1 s por paso.

3.4.21 Opacidad de películas biopoliméricas

La opacidad de las películas biopoliméricas se evaluó utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Ultrospec 3100 pro, Amersham Bioscience, Reino Unido). Las muestras de biopelículas se cortaron en rectángulos y se colocaron en el lado interno de la cubeta del espectrofotómetro. Se realizaron medidas de A_{600} y la opacidad se calculó mediante la siguiente ecuación (225):

$$\text{Opacidad (} A_{600}/\text{mm)} = A_{600}/L \quad (6)$$

donde L (mm) es el espesor de la película.

3.4.22 Permeabilidad al vapor de agua

La WVP se determinó gravimétricamente siguiendo una modificación del método estándar de ASTM E96-00 (226,227). Las muestras de biopelículas se cortaron en discos con un diámetro ligeramente mayor al diámetro de las celdas de acrílico (6 cm de diámetro externo y 3.5 cm de diámetro interno). Las muestras se colocaron sobre la parte superior de las celdas conteniendo agua destilada y se ajustaron con tornillos. Las celdas se colocaron en un desecador que contenía un ventilador para eliminar el aire estancado sobre las celdas, a 25 °C y 0% de HR. Se registró la masa de las celdas cada hora y se utilizaron gráficos de masa ganada en función del tiempo para determinar la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR, por sus siglas en inglés).

La WVP se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{WVP (x } 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}) = (\text{WVTR x L})/\Delta p \quad (7)$$

Donde L es el espesor medio de la película (m) y Δp (KPa) la diferencia de presión de vapor de agua parcial a través de los dos lados de la película. Las muestras se analizaron por triplicado y los valores se informaron como promedio \pm SD.

3.4.23 Solubilidad de películas biopoliméricas

La solubilidad de las biopelículas se determinó como el porcentaje de materia seca de la película luego de su inmersión en agua (228). Se cortaron trozos de película (20 mm x 20 mm), los cuales se secaron a 105 °C hasta peso constante. Luego, se sumergieron las muestras en frascos con 50 ml de agua destilada y se agitaron suavemente durante 24 h a 25 °C. Las soluciones y las películas se vertieron en papel de filtro cualitativo (Whatman #1) para recuperar los trozos de película no disueltos. A continuación, las muestras se enjuagaron con agua destilada y se secaron a 105 °C hasta peso constante para determinar la masa seca final. La solubilidad se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad (\%)} = (\text{Masa seca inicial} - \text{Masa seca final}) \times 100 / \text{Masa seca inicial} \quad (8)$$

3.4.24 Actividad antimicrobiana de películas biopoliméricas

La actividad antimicrobiana de las biopelículas se estudió mediante el ensayo de difusión de disco en agar (229). Para eso, se cortaron discos de 12 mm de diámetro de las distintas películas obtenidas y se colocaron sobre la superficie de placas de agar con agar semi-sólido inoculado con 0.1 ml de un inóculo de *L. monocytogenes* ($\sim 1 \times 10^6$ UFC/ml) preparado según lo descrito en 3.2. Las placas con los discos se conservaron a 4 °C durante 4 h para favorecer la liberación de la NIS (predifusión) y luego se incubaron en estufa a 37 °C por 24 h.

La aparición de un halo de inhibición indicó la actividad antimicrobiana de cada disco. Se utilizó un calibre digital electrónico para medir el diámetro de cada halo y se tomaron 5 medidas por halo. Los valores se informaron como promedio \pm SD.

3.4.25 Tratamiento estadístico

Para la evaluación de las nanopartículas, se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas para cada ensayo y se reportaron los valores promedio \pm desviación estándar (SD). Para los ensayos microbiológicos *in vitro*, se testearon las diferencias entre los tratamientos con ANOVA de una vía ($P < 0.05$). Para los ensayos microbiológicos en carne vacuna, los recuentos se expresaron como log UFC/g antes de obtener los promedios y de realizar el análisis estadístico. Cuando no se detectó crecimiento microbiano, los datos se consideraron como 1 log menos que el mínimo nivel de detección, el cual fue de 200 UFC/g (230). Se utilizó el test de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés) de Fisher ($P < 0.05$).

Las propiedades de las películas biopoliméricas se determinaron al menos por triplicado y los resultados se expresaron como promedio \pm SD. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan ($P < 0.05$) se realizaron para detectar diferencias entre los valores medios, utilizando el programa InfoStat (231).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cuantificación de nisina

En primer lugar, se determinó el rango de concentraciones con respuesta lineal entre 0 y 200 $\mu\text{g/ml}$, en microplacas incubadas a 60 °C por 60 min.

Como se aprecia en la **Figura 10**, los valores de absorbancia presentaron un comportamiento lineal para valores de concentración de NIS entre 0 y 30 $\mu\text{g/ml}$, en línea con lo declarado por el fabricante del kit de BCA.

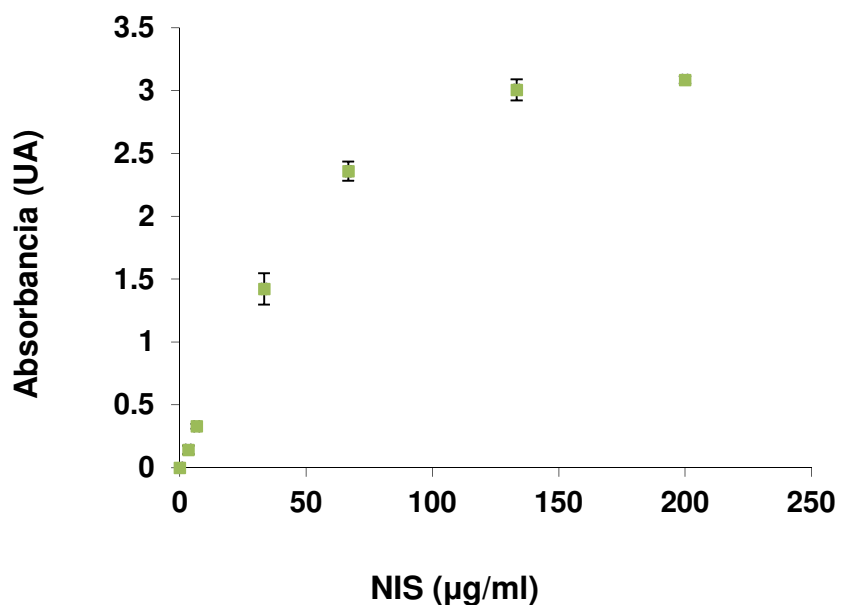


Figura 10. Medidas de absorbancia de soluciones de NIS (0 a 200 $\mu\text{g/ml}$) utilizando el ensayo de BCA con incubación a 60 °C por 60 min.

Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.

A continuación, se evaluaron dos tiempos de incubación (30 y 60 min a 60 °C) para muestras con concentraciones dentro del rango determinado previamente y los resultados se pueden observar en la **Figura 11**.

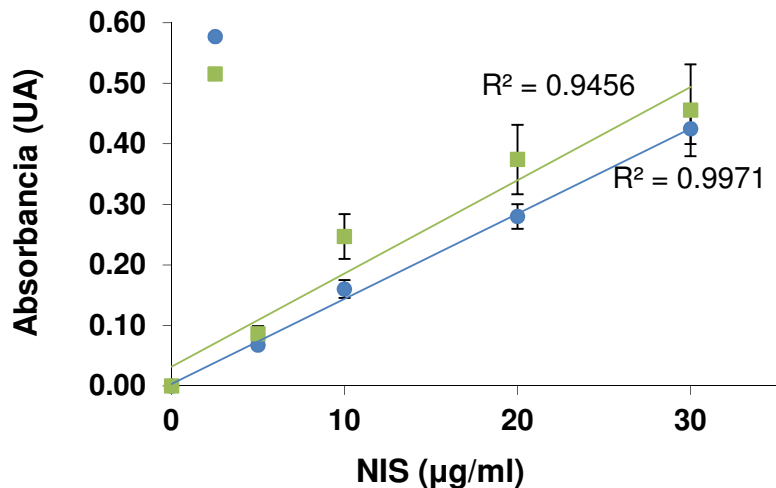


Figura 11. Curvas de calibración de NIS mediante ensayo de BCA con incubación de: (●) 30 min a 60 °C y (■) 60 min a 60 °C. Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.

Si bien las respuestas para ambos períodos de incubación fueron lineales, el valor del cuadrado del coeficiente de correlación (R^2) de la curva de absorbancia medida luego de 30 min fue de 0.997, mientras que el de la curva luego de 60 min fue de 0.95. Por lo tanto, se consideró adecuado realizar los subsiguientes ensayos de cuantificación de NIS con 30 min de incubación a 60 °C.

4.2 Nanopartículas de quitosano/TPP con nisina

4.2.1 Determinación de parámetros para formación de nanopartículas

Se estudiaron los efectos de la variación de tres factores (uno por vez) sobre las propiedades de las nanopartículas de CS/TPP vacías y conteniendo NIS. Los factores estudiados fueron: relación de concentración de ácido acético/CS, relación CS/TPP (v/v) y relación CS/TPP (p/p), y se analizó el tamaño de partícula, PDI y potencial zeta de las nanopartículas preparadas.

En el presente trabajo se estudió la variación de la relación de concentración de ácido acético/CS entre 1.5 y 3.5. Dado que se fijó la concentración de CS en 1 mg/ml, las concentraciones de ácido acético utilizadas se encontraron entre 1.5 y 3.5 mg/ml. Como se observa en la **Tabla 8**, dicha

variación no afectó significativamente el diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las muestras. Por lo tanto, en los subsiguientes ensayos se utilizó la misma relación de concentración de ácido acético/CS que la descrita en el trabajo de Calvo *et al.* (58), es decir 1.75 veces mayor que la de CS.

Tabla 8. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintos niveles de ácido acético en nanopartículas CS/TPP vacías.

A. acético (mg/ml)	Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1.5	153 ± 10 ^a	0.264 ± 0.011 ^a	34.3 ± 2.0 ^a
2	146 ± 12 ^a	0.267 ± 0.019 ^a	33.2 ± 2.2 ^a
2.5	153 ± 9 ^a	0.292 ± 0.019 ^a	35.5 ± 1.0 ^a
3	132 ± 7 ^a	0.256 ± 0.036 ^a	31.8 ± 1.2 ^a
3.5	134 ± 8 ^a	0.288 ± 0.034 ^a	34.4 ± 0.2 ^a

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Con respecto al estudio del efecto de distintas relaciones CS/TPP (v/v) sobre la formación de nanopartículas de CS/TPP, en la **Tabla 9** se puede apreciar que la variación de la relación CS/TPP (v/v) inicial entre 1.8 y 3.6 mg/ml (para una concentración de CS de 1 mg/ml), no presentó un efecto significativo sobre el diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta de las muestras. Por lo tanto, para los ensayos posteriores se fijó la relación CS/TPP (v/v) inicial de 2.5 en base a lo recabado en bibliografía (58,63–66).

Tabla 9. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintas relaciones CS/TPP (v/v) en nanopartículas CS/TPP vacías.

CS/TPP (v/v)	Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1.8	166 ± 16 ^a	0.346 ± 0.035 ^a	31.4 ± 1.8 ^a
2.4	147 ± 6 ^a	0.314 ± 0.011 ^a	31.7 ± 0.7 ^a
3.0	173 ± 6 ^a	0.358 ± 0.034 ^a	32.7 ± 1.3 ^a
3.6	159 ± 6 ^a	0.328 ± 0.021 ^a	30.3 ± 0.5 ^a

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Una vez establecidos los valores de concentración de ácido acético y relación inicial CS/TPP (v/v), se estudió la variación de la relación CS/TPP (p/p) en nanopartículas conteniendo NIS. Según lo

observado en la **Tabla 10**, para una relación CS/TPP (p/p) de 2, el tamaño de partícula y PDI obtenidos fueron significativamente mayores que para el resto de las relaciones ensayadas.

Tabla 10. Resultados promedio de diámetro de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta para distintas relaciones CS/TPP (p/p) en nanopartículas CS/TPP con NIS.

CS/TPP (p/p)	Diámetro (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
2	232 ± 19 ^b	0.272 ± 0.024 ^b	18.8 ± 0.2 ^a
2.5	164 ± 5 ^a	0.197 ± 0.006 ^a	20.8 ± 2.1 ^{ab}
3.0	161 ± 7 ^a	0.203 ± 0.010 ^{ab}	22.7 ± 0.8 ^{ab}
3.5	165 ± 7 ^a	0.221 ± 0.013 ^{ab}	26.7 ± 0.6 ^b

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Asimismo, el valor del potencial zeta exhibió un ascenso conforme la relación CS/TPP (p/p) aumentó, indicando que las nanopartículas serían más estables a mayores relaciones CS/TPP (p/p). Esto podría deberse a que una mayor relación CS/TPP (p/p) representa una mayor cantidad de CS, la cual puede aportar más cargas positivas a las nanopartículas, aumentando el valor de potencial zeta. Si bien generalmente se considera que un sistema coloidal es estable cuando su $|\text{potencial zeta}| > 30$ mV, los tamaños de partícula no presentaron una variación significativa cuando la relación CS/TPP (p/p) fue ≥ 2.5 , por lo que a partir de este valor se obtendrían nanopartículas estables, con una adecuada distribución de tamaño.

4.2.2 Eficiencia de encapsulación

Se obtuvieron valores de EE que variaron entre 0 y 10% en el rango de relaciones CS/TPP (p/p) analizado (2, 2.5, 3 y 3.5). Esto indicaría que las nanopartículas CS/TPP no lograron encapsular al principio activo.

Esto podría deberse a que las interacciones electrostáticas entre NIS y los grupos amino del CS no se ven favorecidas por el pH del medio, ya que tanto los grupos amino del CS ($pK_a = 6.0-6.5$ (53)) como la molécula de NIS ($pI = 8.8$ (118)) poseen carga positiva en el pH de trabajo ($pH \sim 5$), favoreciendo un efecto de repulsión entre ambas moléculas. En principio se planteó la utilización de este sistema teniendo en cuenta que, si bien ambas cargas serían positivas, existen otros

mecanismos por los cuales es posible encapsular activos utilizando nanopartículas de CS/TPP que involucran interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y otras interacciones fisicoquímicas, así como el propio confinamiento físico causado por la gelación controlada del CS (68). De hecho, en un trabajo realizado por Calvo *et al.* se estudió el efecto del pH del medio sobre la eficiencia de encapsulación de insulina en nanopartículas CS/TPP, y se observó que la EE fue de ca. 80% cuando la insulina tenía carga negativa (opuesta a la del CS), mientras que dicho valor se redujo a ca. 30% cuando la insulina tenía carga positiva (232).

Sin embargo, en el presente trabajo, el sistema CS/TPP no logró encapsular a la bacteriocina, por lo que se planteó cambiar el sistema de encapsulación de manera de favorecer las interacciones electrostáticas. Para eso, se incorporó un biopolímero con carga negativa en el medio de trabajo, capaz de interactuar con NIS (carga positiva), como ser el ALG de sodio.

4.3 Nanopartículas de alginato/quitosano con nisina

4.3.1 Diseño experimental y metodología de superficie de respuesta

Las nanopartículas de ALG/CS con NIS preparadas de acuerdo al diseño al experimental (**Tabla 7**) presentaron valores de EE (Y_1) que variaron entre 12.1 y 35.6%, con valores de tamaño de partícula (Y_2) entre 40 y 472 nm. Los valores de potencial zeta (Y_3) se encontraron entre -23.7 y -53.2 mV (**Tabla 11**), y aunque algunas muestras exhibieron valores absolutos por debajo del límite aceptado de estabilidad ($|\text{potencial zeta}| > 30 \text{ mV}$), no se observó aglomeración ni precipitación en ninguna de las muestras analizadas, sugiriendo que las formulaciones estudiadas son estables. Asimismo, todos los valores de potencial zeta fueron negativos, debido a la mayor contribución de los grupos cargados negativamente del ALG a la carga superficial total.

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) reveló que el modelo de mejor ajuste ($P < 0.0001$) para las tres variables dependientes fue el cuadrático (**Tabla 12**). Además, la similaridad entre los valores de R^2 y R^2 ajustado demostró que los tres modelos generados fueron adecuados para predecir las correspondientes respuestas. Las relaciones señal/ruido resultantes, medidas por el

término “precisión adecuada” (superior a 4), indicaron que los modelos fueron adecuados para navegar en el espacio del diseño.

Tabla 11. Respuestas (Y_1 = EE (%), Y_2 = tamaño de partícula (nm), Y_3 = potencial zeta (mV)) observadas para las nanopartículas de ALG/CS con NIS preparadas según diseño experimental (X_1 = ALG (mg/ml), X_2 = ALG/CS (p/p), X_3 = Nisaplin® (mg/ml)).

Corrida	Variables independientes			Variables dependientes		
	X_1 (mg/ml)	X_2 (p/p)	X_3 (mg/ml)	Y_1 (%)	Y_2 (nm)	Y_3 (mV)
1	0.7	5	3.2	30.5	204	-38.7
2	0.3	5	0.8	23.7	57	-46.0
3	0.5	8	0.8	19.3	61	-50.0
4	0.7	2	2	15.1	472	-29.8
5	0.5	8	3.2	31.9	93	-34.6
6	0.5	5	2	21.8	112	-42.1
7	0.7	5	0.8	12.1	104	-53.2
8	0.3	8	2	21.7	122	-33.1
9	0.3	2	2	23.2	403	-31.0
10	0.5	5	2	21.2	106	-42.0
11	0.5	5	2	19.6	175	-41.0
12	0.5	2	0.8	26.5	418	-44.3
13	0.5	2	3.2	32.4	377	-23.7
14	0.7	8	2	15.9	40	-45.6
15	0.3	5	3.2	35.6	86	-33.2

Tabla 12. Resumen del análisis de regresión de las tres respuestas para los modelos cuadráticos.

Respuesta	Significancia	R^2	R^2 ajustado	R^2 predicho	Precisión adecuada
Y_1	<0.0001	0.8877	0.8571	0.7751	15.312
Y_2	<0.0001	0.9223	0.9094	0.8828	16.773
Y_3	<0.0001	0.9758	0.9577	0.9159	25.059

A continuación, se observan las ecuaciones generadas para cada respuesta, despreciando los términos que no fueron significativos ($P < 0.05$):

$$Y_1 = 37.85 - 19.13 X_1 - 13.59 X_3 + 4.67 X_3^2 \quad (9)$$

$$Y_2 = 757.39 - 198.41 X_2 + 14.20 X_2^2 \quad (10)$$

$$Y_3 = -44.40 + 13.54 X_1 - 4.85 X_2 + 12.87 X_3 - 5.71 X_1 X_2 + 0.63 X_2^2 - 1.57 X_3^2 \quad (11)$$

Según la ecuación (9), la EE (Y_1) solo se vio afectada por el contenido de ALG y Nisaplin[®]. La curvatura a lo largo del eje de Nisaplin[®] en el gráfico de la superficie de respuesta indica el efecto general de Nisaplin[®] sobre la EE (**Figura 12a**). En los estudios preliminares realizados se observó que las nanopartículas se agregaban cuando se utilizaron mayores cantidades de Nisaplin[®] para su preparación. Además de NIS, el preparado comercial Nisaplin[®] contiene Na⁺ (335 mg/g de Nisaplin[®]) y Ca²⁺ (5.45 mg/g de Nisaplin[®]) (233). Las concentraciones de Nisaplin[®] utilizadas para preparar las nanopartículas cargadas con NIS variaron entre 0.8 y 3.2 mg/ml, por lo que la adición de Nisaplin[®] implicó el agregado de 4.4-17 μ g/ml (0.11-0.44 mM) de Ca²⁺ y 0.27-1.1 mg/ml (12-47 mM) de Na⁺. Según lo reportado por De *et al.*, la presencia de Na⁺ puede, no sólo interferir con la unión de Ca²⁺ y ALG durante la formación del estado de pre-gel necesario previa a la formación de nanopartículas, sino que también puede competir con el CS, y posiblemente con NIS, para unirse al ALG (234). Por lo tanto, incluso la mayor cantidad de Nisaplin[®] utilizada en este estudio permitió la encapsulación de NIS y la formación de nanopartículas en presencia de todos los constituyentes de nanopartículas, sin ocasionar la agregación de las partículas. Por otra parte, los gráficos de superficie de respuesta (**Figura 12b**) muestran que se obtuvieron valores bajos de EE cuando se utilizaron concentraciones altas de ALG y bajas de Nisaplin[®], mientras que las concentraciones altas de Nisaplin[®] y bajas de ALG llevaron a la formación de nanopartículas con valores de EE más altos. En otras palabras, la EE fue directamente proporcional a la relación de masas Nisaplin[®]/ALG. Dado que el preparado Nisaplin[®] contiene 2.5% de NIS, el contenido de NIS en este trabajo varió entre 20 y 80 μ g/ml y, por lo tanto, se prepararon sistemas con relaciones de masa de NIS/ALG (calculadas) de entre 0.03 y 0.27. Como se puede observar, el proceso de nanoencapsulación fue más eficiente cuando las relaciones se encontraban más cerca del extremo superior de este rango.

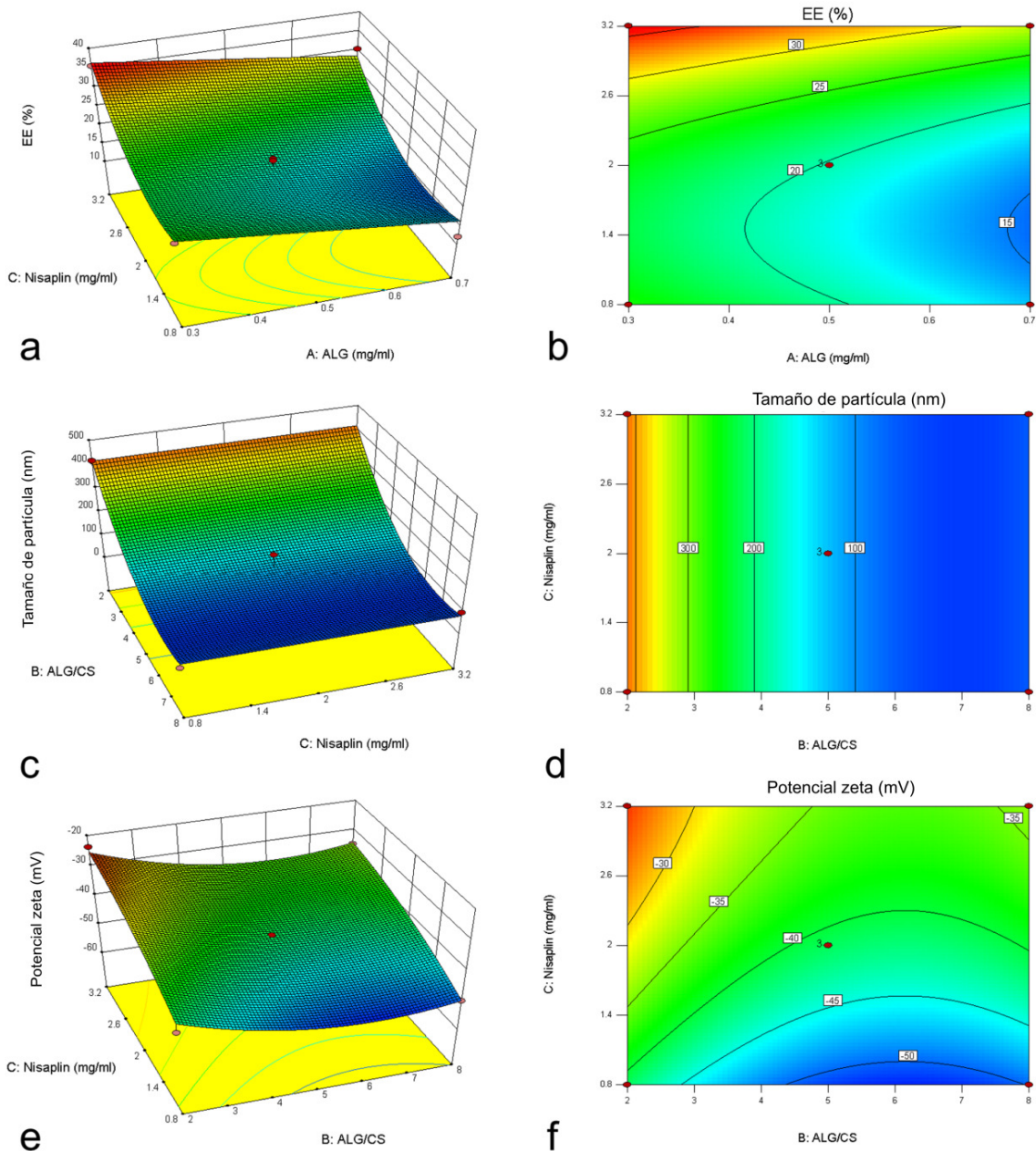


Figura 12. Gráficos de superficie de respuesta 3D y contorno de respuesta generados a partir del diseño de Box-Behnken: (a), (b) efecto de la concentración de Nisaplin® y de ALG sobre la EE para relación ALG/CS= 5 (p/p); (c), (d) efecto de la relación ALG/CS y el contenido de Nisaplin® sobre el tamaño de partícula para ALG= 0.5 mg/ml; (e), (f) efecto del contenido de Nisaplin® y la relación ALG/CS (p/p) sobre el potencial zeta para ALG= 0.5 mg/ml.

La ecuación (10) indica que la relación ALG/CS fue la única variable independiente que tuvo un efecto significativo en el tamaño de partícula (Y_2). La **Figura 12c** y la **Figura 12d** muestran que a

medida que aumentaron las relaciones ALG/CS, se obtuvieron tamaños de partículas más pequeños, lo que implica que un aumento en la concentración de CS llevó a tamaños de partículas más altos. Sarmiento *et al.* también observaron que el tamaño de las nanopartículas de ALG/CS cargadas con insulina dependía principalmente de la relación ALG/CS y que el agregado de CS adicional producía partículas y agregados más grandes (235). Por otra parte, De *et al.* encontraron que las nanopartículas más pequeñas se formaban cuando la relación ALG/CS era de 10 y que cuando se usaron relaciones inferiores a 7, el tamaño de las nanopartículas era mayor y como resultado observaron la agregación de las nanopartículas (234). Los resultados presentados aquí sugieren que se favorecieron las interacciones iónicas entre NIS y ALG en el procedimiento de preparación ya que la incorporación de Nisaplin® a la solución de ALG fue previa a la adición de CS. Como consecuencia, los grupos COO⁻ del ALG que quedaron libres luego del agregado de Nisaplin® sólo pudieron interactuar con una cantidad limitada de CS, por lo que el exceso de este biopolímero condujo a la formación de agregados más grandes.

Como se desprende de la ecuación (11), las tres variables independientes estudiadas tuvieron un efecto significativo sobre el potencial zeta (Y_3). Esto sugirió que la carga superficial total de las nanopartículas dependió de las interacciones electrostáticas entre todos los componentes del sistema, incluidas las interacciones entre los grupos COO⁻ del ALG y los grupos NH₃⁺ de la NIS y del CS, así como de la presencia de iones. Como era de esperar, los contenidos más altos de Nisaplin® y CS condujeron a valores de potencial zeta menos negativos (**Figura 12e y Figura 12f**) debido a una mayor contribución de cargas positivas, y aunque estos constituyentes afectaron negativamente la estabilidad coloidal de las nanopartículas, se obtuvieron valores de potencial zeta satisfactorios ($|\text{potencial zeta}| > 30 \text{ mV}$) en todo el espacio de trabajo.

4.3.2 Optimización de la formulación y validación del modelo

A partir de los modelos generados por el software Design-Expert®, se aplicaron las restricciones descritas anteriormente (**Tabla 6**) para obtener una formulación optimizada. Usando un factor de deseabilidad cercano a 1, la formulación optimizada resultante presentó una concentración de ALG de 0.3 mg/ml, una relación ALG/CS de 7 (p/p) y una concentración de Nisaplin® de 3.2

mg/ml. Los valores de respuesta predichos de Y_1 , Y_2 e Y_3 fueron 36.4%, 64.5 nm y -30.5 mV respectivamente.

La validación del modelo demostró que los valores experimentales de EE, tamaño de partícula y potencial zeta se encontraron dentro de los límites para todos los puntos de control de la formulación optimizados, con valores promedio de EE de $36.1 \pm 0.6\%$, tamaño de partícula de 66.4 ± 8.9 nm y potencial zeta de -31.7 ± 2.6 mV.

4.3.3 Morfología y tamaño

Las nanopartículas sintetizadas siguiendo la formulación optimizada presentaron una buena monodispersidad y un tamaño de partícula homogéneo, como se observa en los ensayos de TEM (**Figura 13**). Además, las micrografías mostraron que las nanopartículas tuvieron un tamaño cercano a 60-70 nm, también en línea con el resultado de diámetro hidrodinámico experimental encontrado por DLS.

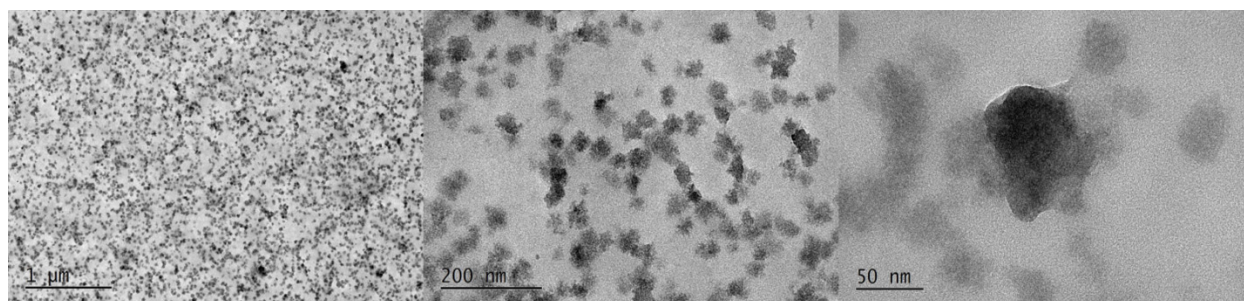


Figura 13. Observaciones de TEM de nanopartículas de ALG/CS con NIS.

Asimismo, las nanopartículas con NIS se estudiaron por AFM y se obtuvieron imágenes para proporcionar más información sobre la morfología de la superficie y el tamaño de las partículas. La **Figura 14** muestra las imágenes obtenidas por AFM en 2D y 3D, en las cuales se pueden apreciar cambios en la topografía de la superficie, sugiriendo la presencia de nanopartículas con una estructura densa sólida. Asimismo, a partir de una estimación aproximada del pico obtenido del análisis topográfico se encontró que las nanopartículas presentaron una altura de ca. 20 nm y un tamaño de partícula de 60-70 nm. Estos resultados fueron a su vez consistentes con los datos obtenidos previamente por análisis TEM y DLS.

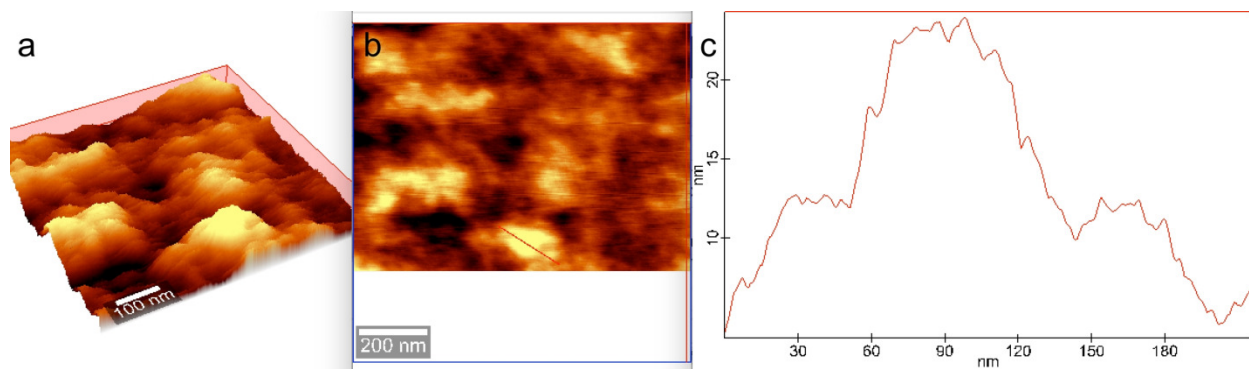


Figura 14. Micrografías de fuerza atómica en (a) 3D, (b) 2D y (c) curva de distribución del tamaño de las nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS. El análisis topográfico se obtuvo a partir de la sección marcada con líneas en las imágenes.

4.3.4 Espectroscopía Raman

Para estudiar las interacciones intermoleculares de las nanopartículas, tanto los componentes individuales como sus combinaciones fueron analizados por espectroscopía Raman.

Los espectros Raman obtenidos (**Figura 15**) mostraron varias bandas atribuibles al ALG, CS y NIS. Si bien las bandas típicas de CS y ALG han sido reportadas en investigaciones anteriores (236-238), el análisis Raman de NIS aún no ha sido reportado previo a este trabajo. De hecho, en el presente estudio los espectros de NIS revelaron la presencia de bandas características de péptidos y proteínas, con modos vibracionales de amida I en 1676 cm^{-1} , amida III en 1245 cm^{-1} , estiramiento C-H de residuos alifáticos en 2880 , 2935 y 2980 cm^{-1} , estiramiento C-S en 625 y 648 cm^{-1} (236), estiramiento C-S con conformación trans en 700 , 720 y 741 cm^{-1} y deformaciones anti-simétricas de cadenas laterales de péptidos en 1425 , 1450 y 1475 cm^{-1} (237).

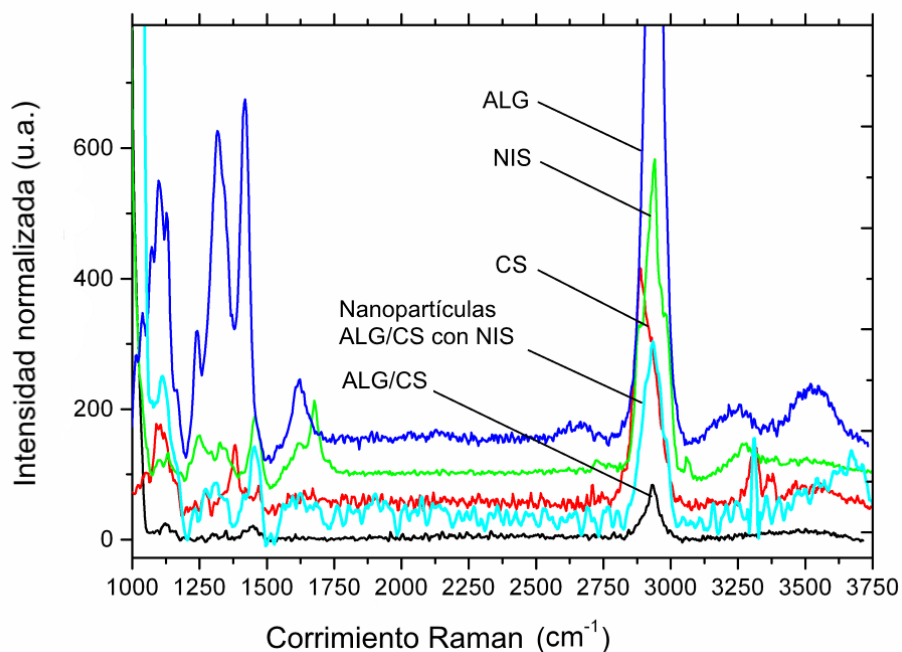


Figura 15. Espectros Raman de ALG, CS, NIS, ALG/CS y nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS.

Un estudio previo mostró que la unión de ALG con Ca^{2+} y Fe^{2+} modificaba la posición de la banda de estiramiento de COO^- simétrica, originalmente en 1413 cm^{-1} (238,239), con corrimientos hacia números de onda más altos (238). En este trabajo, esta banda característica se encontró en 1418 cm^{-1} en la muestra de ALG. Sin embargo, en la muestra de ALG/CS, donde el COO^- del ALG puede interactuar con los grupos NH_3^+ del CS, se observó un desdoble de bandas con corrimiento dando lugar a los picos en 1415 , 1448 y 1477 cm^{-1} . Estos dos últimos picos se destacan por su corrimiento a mayores frecuencias, según lo observado en la deconvolución analítica del espectro Raman correspondiente. Por lo tanto, estos cambios confirmaron la formación de un complejo ALG/CS a través de interacciones iónicas entre los grupos COO^- del ALG y los grupos NH_3^+ del CS.

Asimismo, cuando se analizaron las nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS, la neutralización de los grupos COO^- del ALG con grupos NH_3^+ de la NIS produjo cambios adicionales en los números de onda de las bandas de COO^- , las cuales se desplazaron a 1413 , 1450 y 1472 cm^{-1} . Estos corrimientos podrían deberse a cambios en la conformación y, por lo tanto, en las interacciones entre los grupos COO^- y NH_3^+ del sistema ternario ALG/CS/NIS, que son distintas a las

interacciones que aparecen en la muestra de ALG/CS sin NIS. Además, la banda intensa atribuida a los modos de vibración de la amida I en 1676 cm^{-1} en la muestra de NIS se mitigó en la muestra de nanopartículas cargadas con NIS, como se muestra en la **Figura 16**. Esto podría ser otra evidencia de la unión iónica de NIS y ALG a través de interacciones electrostáticas tras la formación de las nanopartículas, como observaron Zohri *et al.* por espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (114).

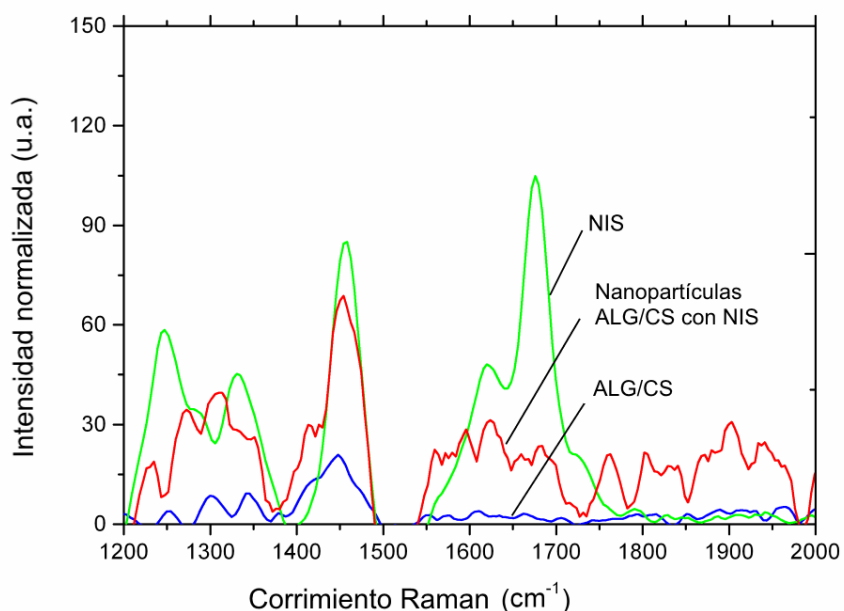


Figura 16. Espectros Raman de NIS, ALG/CS y nanopartículas de ALG/CS cargadas con NIS.

Con el fin de verificar las interacciones que se identificaron previamente mediante los análisis de espectroscopia Raman, se llevaron a cabo medidas complementarias de potencial zeta de las muestras de ALG, CS, NIS, ALG/CS y ALG/NIS. Los cambios en los valores de potencial zeta indicaron la formación de diferentes complejos a través de interacciones iónicas. Inicialmente, el potencial zeta del ALG fue de $-54.1 \pm 4.8\text{ mV}$, mientras que los valores de CS y NIS fueron de $23.7 \pm 1\text{ mV}$ y $12.1 \pm 3.8\text{ mV}$ respectivamente. El agregado de CS a ALG (muestra de ALG/CS) modificó el potencial zeta del ALG a un valor menos negativo de $-43.4 \pm 4.9\text{ mV}$. Este cambio indicó una reducción de la contribución de los grupos cargados negativamente del ALG sobre la carga neta, debido a la neutralización de los grupos COO^- de ALG tras la interacción electrostática con grupos

NH₃⁺ del CS. Este efecto también se observó cuando se agregó NIS a ALG, con un valor de potencial zeta resultante de -26.2 ± 6.4 mV de la muestra ALG/NIS. Dado que el cambio en el valor potencial zeta de ALG/NIS fue mayor que el de ALG/CS, estos resultados sugirieron interacciones electrostáticas más fuertes entre ALG y NIS en comparación con ALG y CS. Asimismo, las nanopartículas cargadas con NIS estudiadas en este trabajo presentaron un potencial zeta de -31.7 ± 2.6 mV, es decir un valor intermedio entre los obtenidos para los sistemas de ALG/CS y ALG/NIS. Por lo tanto, es posible suponer que la NIS no contribuyó a la carga de las nanopartículas de la misma manera que lo hizo en las muestras de ALG/NIS, probablemente debido a su encapsulamiento dentro de las nanopartículas, lo que impidió su exposición en la superficie de nanopartículas.

4.3.5 Determinación de concentración mínima inhibitoria

La actividad antimicrobiana de la NIS libre y la NIS encapsulada se evaluó contra *L. monocytogenes* a 37 °C. La CMI se definió como la concentración de NIS más baja que impidió el crecimiento bacteriano visible, indicada por un cambio en las medidas de absorbancia menor a 0.05 UA (222).

Luego de 24 h de incubación, se observó un efecto inhibitorio del crecimiento de *L. monocytogenes* a partir de 500 UI/ml tanto para la NIS libre como encapsulada. Las concentraciones más bajas (125 y 250 UI/ml) no mostraron efecto inhibitorio (**Figura 17**). Los valores de inhibición alcanzados con NIS libre y encapsulada a 500 UI/ml fueron de $89 \pm 5\%$ y $89 \pm 11\%$ respectivamente y no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos. Por lo tanto, la CMI de la NIS libre y de las nanopartículas cargadas con NIS para el crecimiento de *L. monocytogenes* fue de 500 UI/ml después de 24 h de incubación. Estos resultados fueron similares a los reportados por Zohri *et al.*, quienes encontraron que la CMI de nanopartículas de ALG/CS con NIS fue de 0.5 mg/ml (500 UI/ml) para el crecimiento de *S. aureus* luego de 72 h de incubación. Sin embargo, dichos autores también observaron que la CMI para las muestras tratadas con NIS sin encapsular fue mayor a la de las nanopartículas, a diferencia de lo obtenido en este trabajo (114).

Los porcentajes de inhibición observados a concentraciones mayores fueron similares a los obtenidos con 500 UI/ml, y no se alcanzó a llegar al 100% de inhibición. Debido a esto, la prueba se continuó otras 24 h para verificar si las restantes células viables eran capaces de crecer.

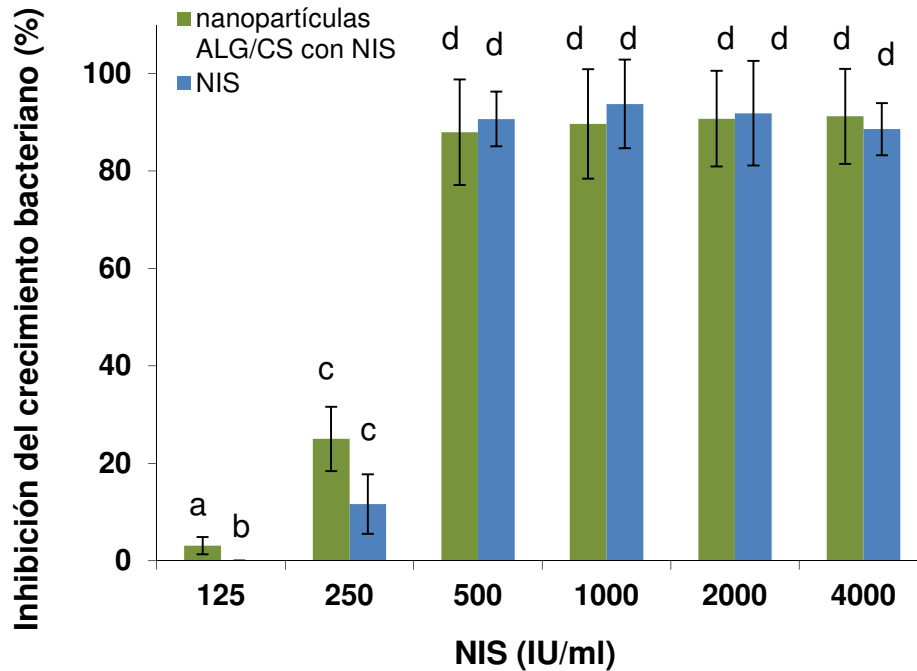


Figura 17. Inhibición del crecimiento (%) de *L. monocytogenes* por NIS y nanopartículas de NIS, luego de 24 h de incubación a 37 °C.

Luego de 48 h de incubación (**Figura 18**), se observaron valores de inhibición menores para los tratamientos con 125, 250 y 500 UI/ml que los obtenidos luego de la incubación por 24. Esto indica que las células bacterianas que sobrevivieron a dichos tratamientos pudieron efectivamente crecer luego de una nueva incubación. En el tratamiento con 500 UI/ml, las nanopartículas cargadas con NIS fueron capaces de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* de una manera más efectiva que la NIS libre, alcanzando un porcentaje de inhibición de $60 \pm 9\%$ para la NIS encapsulada, significativamente mayor ($P < 0.05$) al valor de $43 \pm 2\%$ obtenido para la NIS libre.

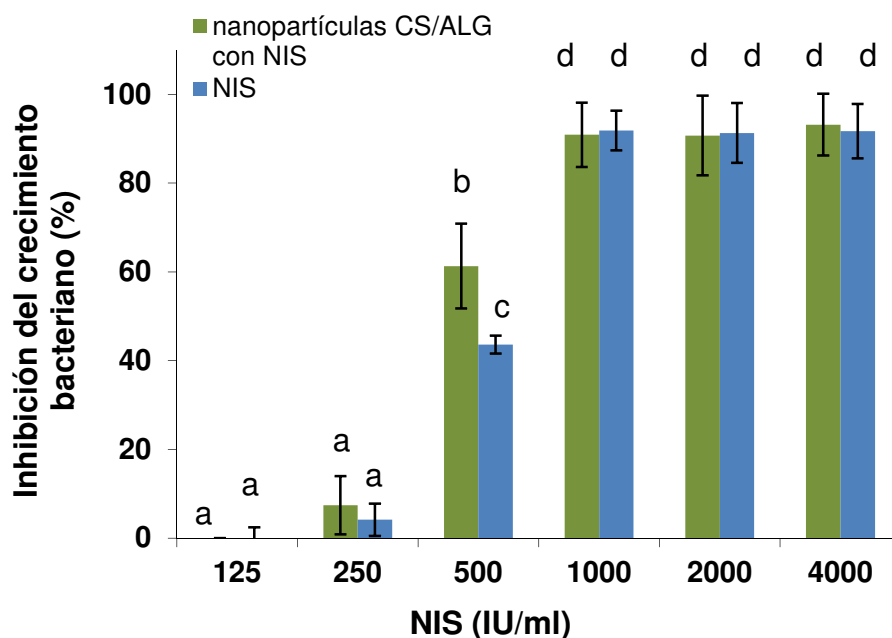


Figura 18. Inhibición del crecimiento (%) de *L. monocytogenes* por NIS y nanopartículas de NIS, luego de 48 h de incubación a 37 °C.

A concentraciones más altas (1000, 2000 y 4000 UI/ml), se observó un fuerte efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, con valores de inhibición de ca. 90% para todos los tratamientos. Como resultado, la CMI tanto de la NIS libre como la encapsulada fue de 1000 UI/ml luego de 48 h de incubación. Además, los porcentajes de inhibición alcanzados con estas concentraciones no se modificaron con respecto a los valores encontrados con 24 h de incubación.

4.3.6 Determinación de concentración mínima bactericida

Se retiraron 10 µl de los pocillos correspondientes a las 24 y 48 h de incubación a 37 °C y se sembraron en placas con medio selectivo PALCAM, de manera de poder visualizar las colonias viables de *L. monocytogenes*.

Luego de 24 h de incubación, la CMB resultante, obtenida a partir de la placa en la que no se observó crecimiento de colonias, fue de 4000 UI/pocillo tanto para las nanopartículas de ALG/CS con NIS como para la NIS libre. Estos resultados fueron observados a las 24 h (**Figura 19**) y se mantuvieron constantes a las 48 h de incubación de las microplacas (**Figura 20**).

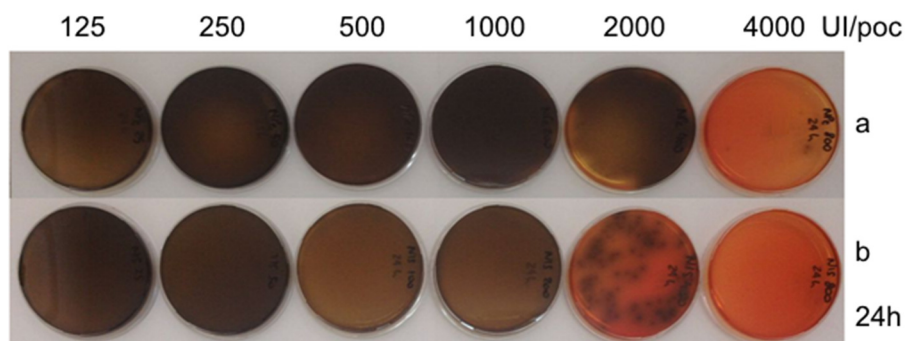


Figura 19. Determinación de CMB luego de 24 h a 37 °C de:
 (a) nanopartículas de ALG/CS con NIS y (b) NIS libre.

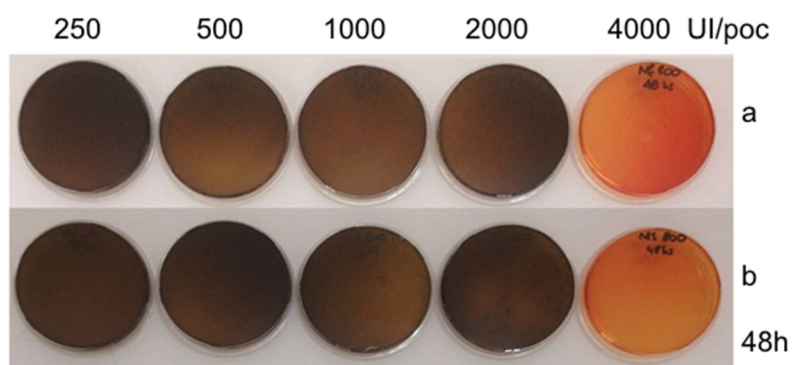


Figura 20. Determinación de CMB luego de 48 h a 37 °C de:
 (a) nanopartículas ALG/CS con NIS y (b) NIS libre.

Las placas correspondientes a las muestras de NIS libre tomadas a las 24 h para las concentraciones de 500, 1000 y 2000 UI/pocillo presentaron un crecimiento menor al de las placas correspondientes de ALG/CS con NIS (**Figura 19**), sugiriendo un mayor efecto bactericida de la NIS libre en comparación con las nanopartículas. Esta observación está en concordancia con los datos de porcentajes de inhibición mostrados en la **Figura 17**, en la cual se observa el mismo patrón para los valores promedios, pero las diferencias entre ellos no son significativas.

4.3.7 Inhibición del crecimiento a 4 °C

Dado que la bacteria *L. monocytogenes* crece en la carne almacenada a temperatura de refrigeración, se consideró relevante estudiar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas cargadas con NIS a dicha temperatura. Para la concentración más baja de NIS (125 UI/ml) se

detectaron cambios significativos en el crecimiento, indicados por un aumento en las medidas de absorbancia > 0.05 UA entre 0 y 24 h (222), en los pocillos tratados tanto con NIS libre como con NIS encapsulada. Las concentraciones ≥ 250 UI/ml no permitieron el crecimiento de *L. monocytogenes* durante el período estudiado.

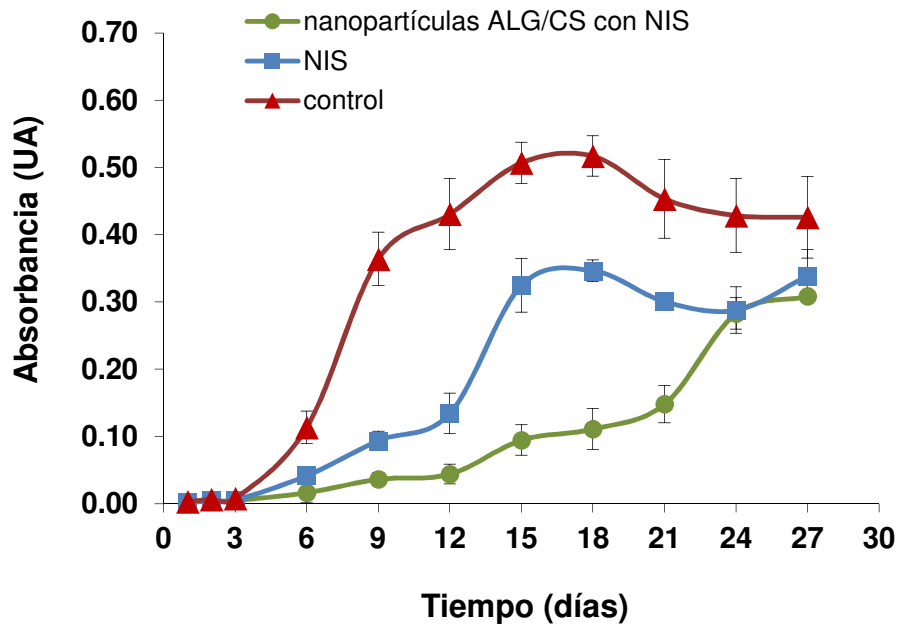


Figura 21. Monitoreo del crecimiento bacteriano (A_{600}) de *L. monocytogenes* a 4 °C, suplementado con: (●) 125 UI/ml de NIS en forma de nanopartículas ALG/CS con NIS, (■) 125 UI/ml de NIS libre y (▲) muestras control (sin tratamiento). Los puntos representan el promedio de 3 réplicas, las barras de error indican la SD.

Como se observa en la **Figura 21**, tanto la NIS libre como la encapsulada fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano durante los primeros días cuando se aplicó a 125 UI/ml (en comparación con la muestra control) y, por lo tanto, esta concentración correspondió a la CMI después de 48 h de incubación a 4 °C para ambos sistemas.

Al comparar los valores de CMI obtenidos a 37 °C y a 4 °C, se puede inferir que la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* fue más efectiva a 4 °C que a 37 °C, en línea con resultados de investigaciones anteriores. En efecto, Pawar *et al.* encontraron que el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne fue menor en todas las muestras tratadas con NIS y almacenadas a 4 °C en comparación con aquellas almacenadas a 37 °C (240). De manera similar, Smigic *et al.*

observaron que la NIS tuvo un efecto mayor en queso conservado a 4 °C que a 37 °C (241). Esto podría deberse a la combinación de los efectos que tienen la NIS y el descenso de temperatura sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* (122), así como también a la posible disminución de la velocidad de degradación de la NIS cuando se encuentra a bajas temperaturas (242).

Por otra parte, mientras que los pocillos tratados con NIS libre mostraron un aumento en la absorbancia (> 0.05 UA) después de 9 días, los pozos suplementados con NIS encapsulada exhibieron un aumento significativo únicamente luego de 15 días. Asimismo, las curvas de absorbancia que representan el crecimiento de *L. monocytogenes* en los pocillos con NIS libre y los pocillos sin tratamiento exhibieron el patrón de las curvas típicas de crecimiento microbiano. De hecho, ambas muestras aparentemente entraron en la fase estacionaria el día 18 y el valor máximo de absorbancia de las muestras tratadas con NIS libre (0.349 ± 0.015 UA) fue significativamente menor que la absorbancia máxima de los pocillos control (0.524 ± 0.028 UA). Sin embargo, cuando las bacterias se trataron con NIS encapsulada, no se observó fase estacionaria durante todo el período de almacenamiento y el valor de absorbancia más alto (0.307 ± 0.007 UA) recién se midió en el día 27.

Estos resultados sugirieron que el proceso de encapsulación controló de manera efectiva la liberación de NIS durante al menos 21 días a temperatura de refrigeración, lo que proporcionó una manera eficaz de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los ensayos *in vitro*. Estos hallazgos son consistentes con varios trabajos que observaron no sólo una liberación lenta y controlada *in vitro* de NIS en diferentes sistemas de nanoencapsulación, sino también una actividad antimicrobiana *in vitro* sostenida de la bacteriocina nanoencapsulada (243). Bernela *et al.* demostraron que la liberación de NIS de un sistema de nanoencapsulación compuesto por CS, ALG y pluronic PF68, ocurrió de manera sostenida por 240 h, a diferencia de la bacteriocina libre que lo hizo en 2 h. En ese mismo estudio, se observó que el efecto inhibitorio de la NIS nanoencapsulada contra *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* y *Enterobacter aerogenes* se prolongó por 20 días (7).

Además, los valores de absorbancia de las muestras tratadas con NIS libre fueron significativamente más altos que aquellos de observados en los pocillos con NIS encapsulada, lo

que indica que las nanopartículas cargadas con NIS tuvieron un efecto en el control del crecimiento bacteriano más fuerte que la bacteriocina libre durante 21 días. Un estudio reciente, en el cual se estudió la actividad antimicrobiana de NIS encapsulada utilizando pectina con distintos grados de metoxilación, demostró que la actividad antimicrobiana (*Arthrobacter* spp. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp.) fue mayor cuando se utilizó pectina de bajo metoxilo y ácido péctico, es decir con mayor número de grupos carboxílicos libres. En dicho estudio se sugirió que ese efecto puede haber sido ocasionado por una disminución de la repulsión electrostática inducida por los cationes divalentes asociados con las paredes celulares bacterianas (244). En consecuencia, es razonable suponer que las nanopartículas cargadas negativamente preparadas en este trabajo también hayan tenido un efecto positivo en la actividad antimicrobiana de los NIS encapsulada en comparación con la NIS cargada positivamente (sin encapsular).

4.3.8 Estudios antibacterianos en carne vacuna envasada a vacío

Las muestras de carne se inocularon con *L. monocytogenes* y luego se agregaron nanopartículas cargadas con NIS o NIS libre de manera de alcanzar concentraciones equivalentes de NIS de 400 y 800 UI/g de carne. Asimismo, se prepararon muestras control (sin tratamiento). Como se muestra en la **Figura 22**, la aplicación de los diferentes tratamientos no afectó el aspecto visual de las muestras.

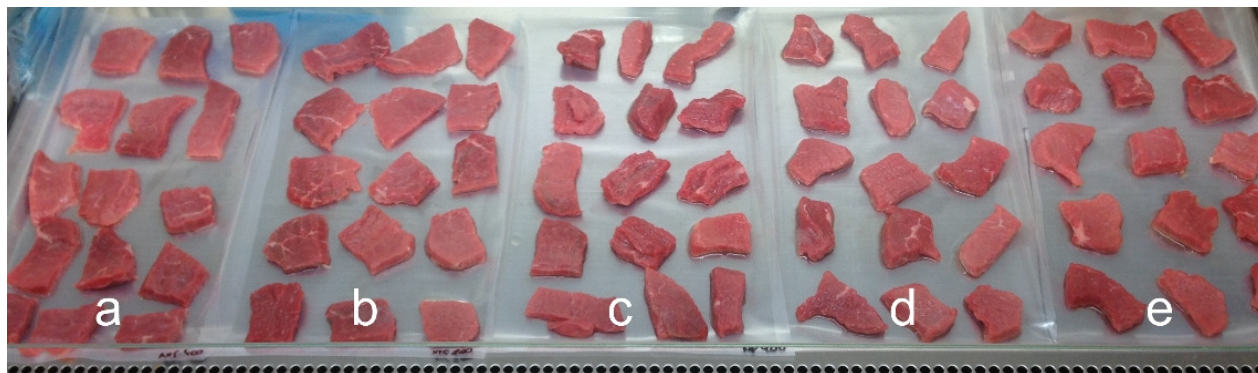


Figura 22. Muestras de carne magra luego de inoculación con *L. monocytogenes* y tratamiento con: (a) NIS libre en 400 UI/ml, (b) NIS libre en 800 UI/ml; nanopartículas cargadas con NIS en (c) 400 UI/ml, (d) 800 UI/ml y (e) control (sin tratamiento).

Durante el almacenamiento a 4 °C, las poblaciones más altas del patógeno fueron encontradas en las muestras control (**Tabla 13**). En dichas muestras sin tratamiento, los recuentos de bacterias fueron significativamente más altos que los observados en muestras de carne tratadas tanto con NIS libre como con NIS encapsulada. Mientras que los recuentos de bacterias en las muestras control se mantuvieron constantes en ca. 4.5 log UFC/g, durante el período de almacenamiento, todas las muestras tratadas mostraron una disminución inicial de ca. 3 log UFC/g. Esto sugirió que la aplicación de nanopartículas con NIS y de NIS libre tuvo un efecto antimicrobiano inmediato en la carne inoculada. De manera similar, Cutter y Siragusa (145) observaron que la aplicación de NIS en spray en carne vacuna redujo de manera inmediata ca. 2 log UFC/cm² el crecimiento de *L. monocytogenes*.

Tabla 13. Efecto de NIS libre y de las nanopartículas de ALG/CS (NPs) cargadas con NIS sobre *L. monocytogenes* (UFC/g) en carne magra durante el almacenamiento a 4 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)				
	0	4	10	17	24
Control*	4.5 ± 0.2 ^{a, AB}	4.9 ± 0.2 ^{a, B}	4.3 ± 0.7 ^{a, AB}	4.2 ± 0.5 ^{a, A}	4.5 ± 0.4 ^{a, AB}
NIS 400 UI/g*	1.3 ± 0.0 ^{b, C}	2.3 ± 0.1 ^{b, B}	3.6 ± 0.5 ^{a, A}	3.1 ± 0.8 ^{a, AB}	2.7 ± 1.2 ^{bc, AB}
NPs 400 UI/g*	1.3 ± 0.0 ^{b, B}	1.3 ± 0.0 ^{c, B}	3.5 ± 0.6 ^{a, A}	3.1 ± 0.8 ^{a, A}	3.9 ± 0.5 ^{ac, A}
NIS 800 UI/g*	1.3 ± 0.0 ^{b, B}	1.3 ± 0.0 ^{c, B}	1.6 ± 0.6 ^{b, B}	3.2 ± 0.7 ^{a, A}	2.0 ± 1.2 ^{d, AB}
NPs 800 UI/g*	1.3 ± 0.0 ^{b, A}	1.3 ± 0.0 ^{c, A}	1.6 ± 0.6 ^{b, A}	1.6 ± 0.6 ^{b, A}	1.7 ± 0.8 ^{bd, A}

* Los valores se expresaron como promedio log (UFC/g) ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada tiempo ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada tratamiento ($P < 0.05$).

Las muestras tratadas con NIS libre en 400 UI/g mostraron un aumento significativo en los recuentos bacterianos a los 4 días, mientras que las nanopartículas con NIS mostraron un aumento en los recuentos bacterianos únicamente a los 10 días. Además, después de 17 días de almacenamiento a 4 °C, los recuentos bacterianos de muestras de carne tratadas con NIS libre a 800 UI/g fueron dos veces más altos que los de las muestras tratadas con nanopartículas cargadas con NIS a la misma concentración (3.2 ± 0.7 log UFC/g y 1.6 ± 0.6 log UFC/g, respectivamente). De hecho, el efecto inhibitorio de las nanopartículas cargadas con NIS en 800 UI/g también se

observó después de 24 días de almacenamiento. Estos hallazgos sugirieron que el crecimiento microbiano comenzó más tarde en las muestras tratadas con nanopartículas cargadas con NIS, en línea con el trabajo de Huq *et al.*, quienes informaron que la NIS microencapsulada ocasionó inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* durante su almacenamiento a 4 °C (171).

Los resultados de los estudios antimicrobianos en carne vacuna magra fueron consistentes con los de los análisis *in vitro*, mostrando que las nanopartículas cargadas con NIS presentaron una actividad antimicrobiana sostenida, lo que permitiría la aplicación de concentraciones de NIS más bajas para obtener el mismo efecto antibacteriano en muestras de carne refrigerada por al menos 10 días. De hecho, es bien sabido que la encapsulación de NIS puede superar las limitaciones que surgen de su aplicación directa en sistemas alimentarios, como su degradación por enzimas proteolíticas (243). Otros estudios más recientes han demostrado que la formación de complejos de NIS con biopolímeros cargados negativamente mejora la estabilidad proteolítica de la bacteriocina, observándose que la estabilidad estaba relacionada con el grado de grupos cargados negativamente del biopolímero (245). De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, las nanopartículas cargadas con NIS exhibieron una actividad antimicrobiana mejorada posiblemente debido a su liberación controlada del sistema de nanoencapsulación y también debido a la carga superficial negativa de las nanopartículas, que a su vez confirió protección a la NIS contra su degradación proteolítica y disminuyó la repulsión electrostática con componentes de las paredes celulares bacterianas.

4.4 Biopelículas de quitosano con nanopartículas de nisina

4.4.1 Morfología

Se prepararon soluciones formadoras de película de CS, conteniendo NIS (1000 y 6000 UI/ml), nanopartículas de ALG/CS de manera de alcanzar concentraciones (equivalentes) de 1000 y 6000 UI/ml de NIS, y películas control (sin NIS ni nanopartículas). Dichas soluciones se vertieron en placas, y luego de secadas se obtuvieron las películas, las cuales pudieron ser desprendidas con facilidad de las placas.

Tal como se observa en la **Figura 23**, las biopelículas de CS fueron transparentes, continuas y con buena flexibilidad. Sin embargo, la incorporación de NIS libre tuvo un efecto negativo en la homogeneidad de las películas y a medida que la concentración de NIS fue mayor se formaron zonas más opacas y agregados o depósitos de material, generando zonas más opacas y rígidas. Estas características fueron observadas también por Grower *et al.*, quienes sugirieron que estarían relacionadas con la incorporación del cloruro de sodio encontrado inherentemente en Nisaplin® (246), la forma comercial de NIS utilizada en el presente trabajo.

Por otra parte, las biopelículas de CS con incorporación de nanopartículas de ALG/CS con NIS conservaron la flexibilidad y rigidez original. Si bien estas películas fueron transparentes, se formaron unos muy pequeños agregados que pudieron ser notados sólo a trasluz, aumentando su presencia conforme aumentó la concentración de las nanopartículas en la biopelícula. Estos resultados fueron concordantes con lo observado en estudios previos relacionados con la incorporación de nanopartículas a biopelículas de CS, probablemente debido a que la incorporación afectó la organización de las cadenas biopoliméricas y generó distintas irregularidades (217). Boelter *et al.* sugirieron que estas irregularidades también podrían estar asociadas con la separación de fase de los aditivos de la matriz durante el secado de la biopelícula, cuando los aditivos no son completamente compatibles con la matriz biopolimérica (46).



Figura 23. Películas de: (a) CS y de CS con (b) 1000 UI/ml de NIS, (c) 6000 UI/ml de NIS, (d) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente).

Para un análisis más detallado de la microestructura, se obtuvieron imágenes por SEM de las superficies y de las secciones transversales de las películas biopoliméricas. En línea con las observaciones macroscópicas, las superficies y secciones transversales de las películas de control (**Figura 24** y **Figura 25**, respectivamente) y de las películas con NIS a 1000 UI/ml presentaron un

aspecto suave y continuo, sugiriendo una disposición compacta de las cadenas poliméricas y que, por lo tanto, la incorporación de NIS a niveles bajos no alteró la microestructura de las películas.

Por el contrario, las superficies y secciones transversales de las películas con mayor concentración de NIS no fueron uniformes y presentaron rugosidades. De hecho, un estudio previo reportó características morfológicas similares en películas de CS con NIS (187). En general, cuando la NIS es incorporada a una matriz biopolimérica, ésta se dispersa en las regiones amorfas de la película, pero cuando el péptido se incorpora en altas concentraciones, puede saturar estas áreas amorfas e interferir con las interacciones polímero/polímero de las regiones cristalinas (10). Por lo tanto, estos resultados indicaron que el agregado de NIS a 6000 UI/ml ocasionó cambios en la macro y microestructura de las biopelículas, debido a la irrupción de la NIS en la red biopolimérica.

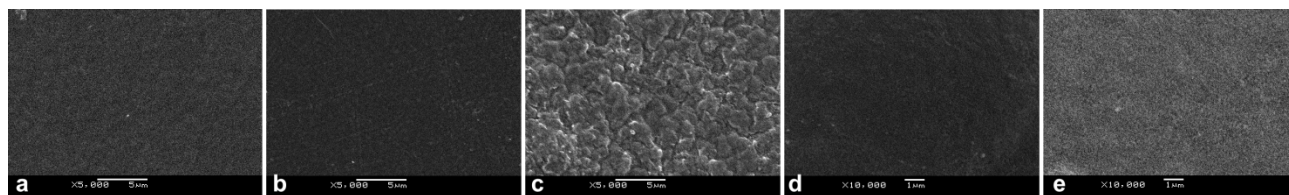


Figura 24. Micrografías obtenidas por SEM de la superficie de las películas de (a) CS y de CS con: (b) NIS a 1000 UI/ml, (c) NIS a 6000 UI/ml, nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente).

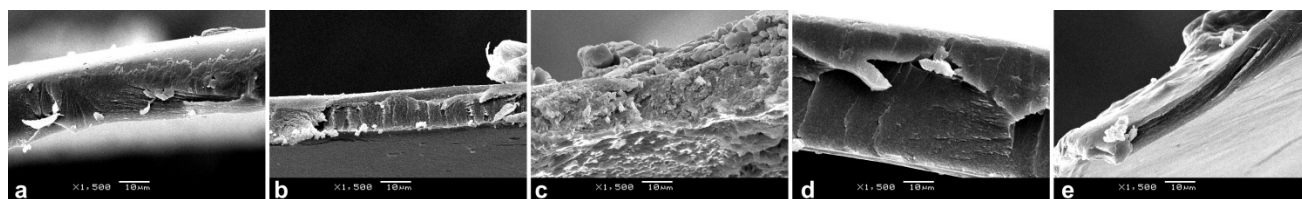


Figura 25. Micrografías obtenidas por SEM del corte transversal de películas de (a) CS y de CS con: (b) NIS a 1000 UI/ml, (c) NIS a 6000 UI/ml, nanopartículas de ALG/CS con NIS a 1000 UI/ml de NIS (equivalente) y (e) nanopartículas de ALG/CS con NIS a 6000 UI/ml de NIS (equivalente).

4.4.2 Espesor

El espesor de las películas biopoliméricas es un parámetro crucial para determinar las propiedades físicas y mecánicas de las biopelículas. En este trabajo, se determinó el espesor de

las distintas biopelículas, tanto de las películas de CS control (sin ningún agregado) como de aquellas con incorporación de NIS y de nanopartículas ALG/CS en niveles equivalentes (1000 y 6000 UI/ml).

Los espesores obtenidos variaron entre 0.021 y 0.043 mm para las distintas biopelículas, con valores de SD consistentes con lo reportado previamente para películas comestibles delgadas (247).

Tal como se observa en la **Tabla 14**, las películas control de CS, es decir sin agregado de NIS ni de nanopartículas, presentaron un espesor de 0.021 ± 0.003 mm, al igual que la película con agregado de nanopartículas con concentración equivalente de 1000 UI/ml. Sin embargo, la biopelícula con NIS libre (1000 UI/ml) presentó un espesor mayor que el de la película con la bacteriocina encapsulada, y este efecto también se observó para las concentraciones de 6000 UI/ml. De hecho, el espesor más alto lo exhibió la película de CS con NIS a 6000 UI/ml, alcanzando un valor promedio de 0.043 ± 0.006 mm.

Tabla 14. Espesor de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.

Tratamiento	Espesor (mm) *
0 UI/ml	0.021 ± 0.003 ^c
NIS 1000 UI/ml	0.026 ± 0.005 ^{bc}
NPs 1000 UI/ml	0.021 ± 0.004 ^c
NIS 6000 UI/ml	0.043 ± 0.006 ^a
NPs 6000 UI/ml	0.034 ± 0.006 ^b

* Promedio \pm SD (n= 3).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en los promedios ($P < 0.05$).

Estos resultados indicaron que tanto el agregado de NIS libre como encapsulada ocasionó un incremento del espesor de las biopelículas. El aumento del espesor debido al agregado de nanopartículas a biopelículas ya fue reportado anteriormente, el cual fue atribuido al aumento del contenido de sólidos en las soluciones formadoras de películas y al tipo de los aditivos incorporados (46,248). Asimismo, otras investigaciones revelaron que el agregado de NIS libre también ocasionó un incremento en el espesor de biopelículas, e incluso se encontró que el espesor aumentó conforme se incrementó la concentración del péptido, debido a un aumento

del peso total de las soluciones formadoras de película, así como a la formación de agregados (20), en línea con las observaciones del presente trabajo. Además, otros estudios informaron que la presencia de cloruro de sodio en la formulación comercial Nisaplin® condujo a la formación de cristales de sal, aumentando el espesor de las películas con NIS (183,246).

4.4.3 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas de los envases de alimentos afectan directamente a la apariencia del alimento y, por consiguiente, a la aceptación del producto envasado. La transmisión de luz de las películas biopoliméricas se evaluó mediante medidas de absorbancia para determinar el grado de opacidad. Los valores más altos de opacidad indicaron una menor transparencia de las muestras de película.

Tabla 15. Opacidad de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.

Tratamiento	Opacidad (%) *
0 UI/ml	2.5 ± 0.3 ^c
NIS 1000 UI/ml	3.1 ± 0.4 ^c
NPs 1000 UI/ml	2.6 ± 0.2 ^c
NIS 6000 UI/ml	16.9 ± 1.5 ^a
NPs 6000 UI/ml	4.9 ± 0.7 ^b

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas en los promedios ($P < 0.05$).

En la **Tabla 15** se observa que el valor de opacidad de las películas control fue de $2.5 \pm 0.3\%$, comparable con aquellos de películas con NIS libre y encapsulada en la concentración más baja (1000 UI/ml). Sin embargo, la transparencia de las películas se vio significativamente afectada cuando se aumentó la concentración de los aditivos incorporados. El efecto del agregado de NIS libre (6000 UI/ml) fue mayor que el del péptido encapsulado, alcanzando valores de opacidad de 16.9 ± 1.5 y $4.9 \pm 0.7\%$ respectivamente. De manera similar, Imran *et al.* informaron que la incorporación de nanoliposomas de lecitina a biopelículas de HPMC permitió mejorar las propiedades ópticas de las mismas en comparación a las películas con lecitina sin encapsular (47).

Por lo tanto, estos resultados sugirieron que la encapsulación permitió una mejor distribución del péptido a lo largo de la matriz biopolimérica, mejorando la transparencia de las biopelículas preparadas.

4.4.4 WVP

El intercambio de humedad con la atmósfera circundante puede afectar la vida útil de los alimentos, por lo que es conveniente estudiar la WVP de las biopelículas para envasado de alimentos. En la **Tabla 16** se observan los resultados obtenidos para las distintas películas.

Las películas control de CS presentaron un valor de WVP de $3.54 \pm 0.67 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, similar a los valores reportados en trabajos anteriores (249,250). Además, dicho valor no tuvo diferencias significativas con los valores de WVP de las películas con incorporación de NIS libre y de nanopartículas de ALG/CS conteniendo 1000 UI/ ml de NIS, presentando los valores más bajos de WVP.

Tabla 16. WVP de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.

Tratamiento	WVP ($\times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) *
0 UI/ml	3.54 ± 0.67^c
NIS 1000 UI/ml	3.88 ± 0.61^c
NPs 1000 UI/ml	3.39 ± 0.25^c
NIS 6000 UI/ml	6.32 ± 0.19^a
NPs 6000 UI/ml	5.08 ± 0.45^b

* Promedio \pm SD (n= 3).

Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Por otra parte, la WVP aumentó significativamente con el agregado de nanopartículas en concentración de 6000 UI/ml y fue aún más alta con la incorporación de NIS sin encapsular. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pranoto *et al.*, quienes observaron que los valores de WVP de las biopelículas estudiadas aumentaron con el agregado de agentes antimicrobianos tales como NIS y sorbato de potasio, ya que los mismos contribuyeron a extender las interacciones intermoleculares, interrumpiendo la matriz biopolimérica y permitiendo así el paso del vapor de agua (174). Asimismo, otra investigación propuso que los grupos hidrofílicos -OH y

-COOH introducidos por la NIS aumentaron la retención de humedad y la tasa de transmisión de vapor de agua (177). Por último, el efecto de la incorporación de NIS sobre los valores de WVP también podría estar relacionado con el contenido de sal de Nisaplin[®], el cual probablemente otorgó a las películas una mayor afinidad por el agua (183).

Dado que la WVP es una medida de la facilidad con la cual la humedad puede penetrar y atravesar un material, los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron que, si bien las nanopartículas de CS/ALG conteniendo NIS en 6000 UI/ml interrumpieron la matriz biopolimérica, esta interrupción fue menor a la ocasionada por la NIS libre, por lo que el agregado de NIS encapsulada permitió un pasaje de humedad menor en comparación al agregado de NIS libre. Asimismo, es plausible que al encapsular el péptido, sus grupos hidrofílicos hayan quedado menos expuestos, mejorando las propiedades de barrera de las películas con incorporación de nanopartículas con respecto a aquellas con NIS libre.

4.4.5 Solubilidad en agua

La integridad y la resistencia al agua de las películas biopoliméricas fueron evaluadas a través de su solubilidad en agua y los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Solubilidad de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.

Tratamiento	Solubilidad (%) *
0 UI/ml	16.6 ± 1.1 ^c
NIS 1000 UI/ml	25.3 ± 2.6 ^b
NPs 1000 UI/ml	23.9 ± 3.4 ^b
NIS 6000 UI/ml	37.5 ± 7.4 ^a
NPs 6000 UI/ml	28.2 ± 1.1 ^b

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios ($P < 0.05$).

La película control presentó el valor más bajo de solubilidad (16.6 ± 1.1%), el cual aumentó significativamente conforme se aplicaron los distintos tratamientos con NIS libre y encapsulada. Al igual que en el estudio de la WVP, la película con la mayor solubilidad fue la de CS con NIS en

6000 UI/ml. Estos hallazgos también pueden atribuirse a los grupos hidrofílicos contribuidos por la NIS, así como al efecto del contenido de sal presente en el producto comercial, Nisaplin®.

Por otra parte, las películas con la bacteriocina nanoencapsulada en la concentración más alta presentaron una solubilidad similar a la de las películas con NIS libre y encapsulada en la concentración de 1000 UI/ml, permitiendo una mayor incorporación de NIS sin afectar la solubilidad de las películas. Esto podría deberse a una menor exposición de los grupos hidrofílicos de la bacteriocina debido al proceso de nanoencapsulación.

4.4.6 Propiedades mecánicas

Los materiales para envasado de alimentos deben mantener su integridad al soportar estrés durante su manipulación, almacenamiento y distribución (31). Para evaluar las propiedades mecánicas de las biopelículas se realizaron ensayos de tracción. Los resultados de σ_{\max} y ϵ se observan en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Propiedades mecánicas de biopelículas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) ALG/CS.

Tratamiento	σ_{\max} (MPa)*	ϵ (%)*
0 UI/ml	29.1 ± 5.4 ^a	38.2 ± 6.5 ^a
NIS 1000 UI/ml	16.9 ± 5.1 ^{bc}	20.1 ± 3.5 ^b
NPs 1000 UI/ml	20.9 ± 6.9 ^b	19.0 ± 3.9 ^b
NIS 6000 UI/ml	11.4 ± 2.0 ^c	15.3 ± 6.6 ^b
NPs 6000 UI/ml	22.6 ± 0.8 ^b	19.8 ± 5.3 ^b

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Las películas de CS control fueron las que presentaron el valor más alto de σ_{\max} y el más alto de ϵ . De hecho, tanto la incorporación del péptido libre como encapsulado ocasionó disminuciones significativas tanto en σ_{\max} como en ϵ . Estos resultados están en línea con otras investigaciones

que han reportado que la incorporación de NIS (174,177,180,251) así como de nanopartículas (30,43), afectó las propiedades mecánicas de distintas matrices biopoliméricas.

En el presente trabajo, si bien en todos los casos se observaron reducciones en los valores de σ_{\max} y de ϵ , estos cambios fueron mayores en el caso de las películas con NIS a 6000 UI/ml. Tal como se mencionó anteriormente a partir de las observaciones visuales y por SEM (4.4.1), las películas que contenían 6000 UI/ml exhibieron áreas rugosas y zonas con agregados, y estas características pueden haber afectado negativamente las propiedades mecánicas de las películas debido a la formación de una película con una estructura más débil (251). Además, la sal presente en el preparado comercial Nisaplin[®], utilizado para preparar la solución de NIS, también puede haber alterado las propiedades mecánicas debido a su alta afinidad por el agua, la cual es un efectivo agente plastificante para la mayoría de los biopolímeros, que como tal puede afectar las propiedades mecánicas de las películas (196).

4.4.7 Propiedades térmicas

La estabilidad térmica de las películas de CS control y con NIS libre y NIS encapsulada se evaluó mediante DSC. Los resultados se describen en la **Tabla 19** y los termogramas más relevantes se presentan en la **Figura 26**.

Tabla 19. Temperaturas máximas (T_p) de las películas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) de ALG/CS, obtenidas por DSC, para proceso endotérmico (primer ciclo de calentamiento, 30-180 °C) y exotérmico (segundo ciclo de calentamiento, 30-320 °C).

Tratamiento	Proceso	
	Endotérmico T_p (°C)	Exotérmico T_p (°C)
Control	55.3 ± 1.5 ^a	296.9 ± 1.2 ^{ab}
NIS 1000 UI/ml	50.9 ± 2,4 ^a	292.1 ± 1.7 ^{bc}
NIS 6000 UI/ml	51.6 ± 5.3 ^a	281.6 ± 6.8 ^d
NPs 1000 UI/ml	58.7 ± 12.1 ^a	300.8 ± 5.6 ^a
NPs 6000 UI/ml	59.8 ± 7.2 ^a	287.5 ± 2.5 ^{cd}

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada proceso ($P < 0.05$).

Luego del primer ciclo de calentamiento, todas las muestras exhibieron un pico endotérmico centrado en un rango entre 50.9 y 59.8 °C, atribuido a la evaporación del agua presente en las muestras, que puede relacionarse con la capacidad de retención de agua y la fuerza de las interacciones agua-carbohidrato (31,252).

En el segundo ciclo de calentamiento, todas las películas presentaron un solo pico exotérmico (T_p) entre 280-300 °C, asignado a la despolimerización y descomposición pirolítica del esqueleto del polisacárido (215). No se observó temperatura de transición vítrea, probablemente porque la descomposición impidió su determinación (252). La T_p del evento exotérmico de la película de CS control se encontró a 296.9 ± 1.2 °C, en línea con resultados publicados anteriormente (215,227,252). Cuando se incorporó NIS a 1000 y 6000 UI/ml la formulación, los valores de T_p disminuyeron a 292.1 ± 1.7 °C y 281.6 ± 6.8 °C respectivamente. Es decir que la disminución en T_p fue mayor a medida que aumentó la concentración del agente antimicrobiano. Por el contrario, cuando se añadió el péptido nanoencapsulado, solo se observó una disminución en el valor de T_p cuando se utilizó la mayor concentración.

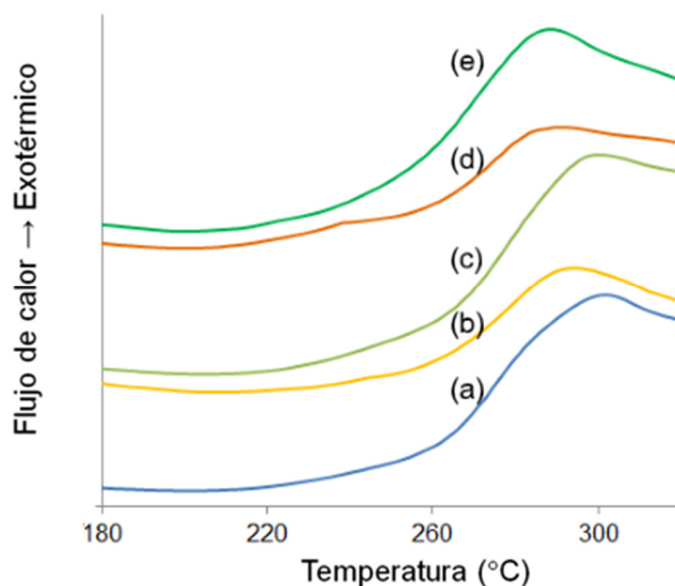


Figura 26. Termogramas de las películas de CS con incorporación de distintos niveles de NIS y de nanopartículas (NPs) de ALG/CS, obtenidos por DSC (segundo ciclo de calentamiento): (a) control, (b) NIS 1000 UI/ml, (c) NPs 1000 UI/ml, (d) NIS 6000 IU/ml y (e) NPs 6000 UI/ml.

Según lo propuesto por Sun *et al.*, quienes informaron que la T_p de películas de CS se redujo tras la incorporación de polifenoles de manzana, es posible que la NIS haya interrumpido las interacciones polímero-polímero, formando matrices menos estables debido a enlaces de hidrógeno intermoleculares más débiles, resultando en valores de T_p más bajos (215). Estos resultados también concuerdan con lo observado anteriormente en este trabajo en relación a la interrupción de las regiones cristalinas de las películas debido a los altos contenidos de NIS cuando fue incorporada a 6000 UI/ml.

4.4.8 XRD

Se realizaron análisis de XRD para estudiar los efectos de la incorporación de NIS libre y encapsulada sobre las propiedades estructurales de las películas de CS. En la **Figura 27** se observa que la película de CS presentó un pico amplio en ca. $2\theta = 25^\circ$, el cual puede ser asignado a la fase amorfa de la estructura de la película de CS (87). Además, la incorporación del péptido en forma libre y encapsulada a 1000 UI/ml parecería no ocasionar cambios significativos en el grado de orden de las películas.

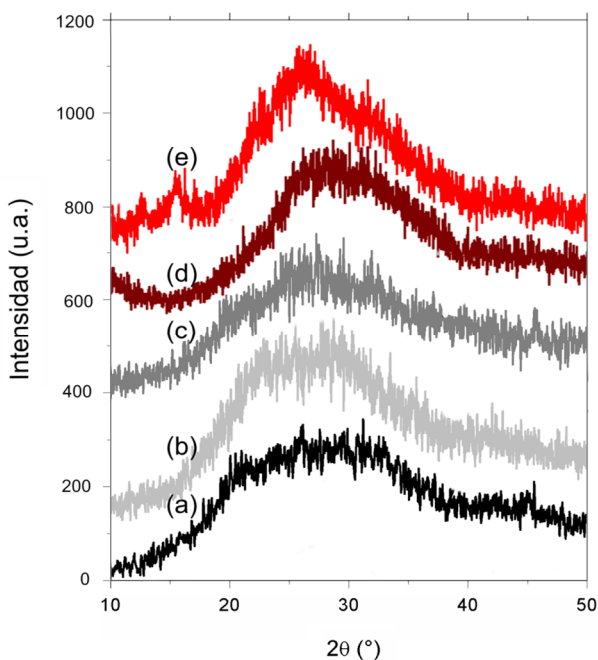


Figura 27. Diffractogramas de películas de CS: (a) control, (b) con NIS 1000 UI/ml, (c) con NIS 6000 UI/ml, (d) con nanopartículas ALG/CS en 1000 UI/ml, y (e) con nanopartículas ALG/CS en 6000 UI/ml.

Sin embargo, cuando la concentración de NIS fue de 6000 UI/ml, los picos exhibidos en los difractogramas de las películas con nanopartículas aparecieron más definidos que los correspondientes a los de las películas con NIS libre, sugiriendo que la incorporación de NIS encapsulada mejoró el grado de orden de las películas en comparación a la incorporación de la bacteriocina sin encapsular.

4.4.9 Actividad antimicrobiana

Se llevaron a cabo ensayos de difusión en agar para estudiar la actividad antibacteriana de las películas de CS control (sin agregado) y de CS conteniendo NIS libre y NIS encapsulada, con concentraciones equivalentes de 1000 y 6000 UI/ml.

De todas las biopelículas estudiadas, las únicas que presentaron halo de inhibición fueron aquellas con incorporación de NIS libre en concentración de 6000UI/ml con diámetro promedio de 5.1 ± 4.0 mm. En las condiciones experimentales de los ensayos, tanto las biopelículas de CS como las de CS con NIS encapsulada no demostraron actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* (**Figura 28**).



Figura 28. Zonas de inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* en pruebas de difusión en agar de biopelículas de CS (a) control, (b) con nanopartículas (NPs) ALG/CS en concentración equivalente de 6000 UI/ y (c) con NIS 6000 UI/ml.

En línea con estos resultados, Imran *et al.* compararon la actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* de películas de HPMC conteniendo NIS y NIS nanoliposomada mediante ensayos de difusión en agar, encontrando que la acción antibacteriana de las películas con el péptido encapsulado fue menor a la de las películas con NIS libre, probablemente debido a la liberación controlada de la NIS por parte de los liposomas (47). En el presente estudio, se contempló un tiempo de predifusión de 4 h para favorecer la liberación de NIS de las nanopartículas, tal como

se detalló en 3.4.24. En vista de los resultados obtenidos, se realizaron ensayos adicionales con un tiempo de predifusión de 20 h. De todas maneras, no se observó la formación de halos de inhibición por lo que se concluyó que la estrategia de incorporación de nanopartículas de ALG/CS conteniendo NIS no demostró actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* en las condiciones de los ensayos realizados.

Por lo tanto, se investigó una alternativa para obtener biopelículas de CS con NIS con una mayor actividad antibacteriana. La hipótesis de trabajo se basó en que el agregado de un biopolímero más hidrofílico y con mayor solubilidad que el CS permitiría modular la solubilización y liberación del péptido y posiblemente mejorar la actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* de biopelículas de CS con NIS.

4.5 Biopelículas de quitosano/carboximetil quitosano con nisina

4.5.1 Morfología

Se prepararon soluciones formadoras de película con diferentes relaciones de masa CS/CMCS conteniendo NIS (1000 y 6000 UI/ml) y control (sin NIS). Dichas soluciones se vertieron en placas, y luego de secadas se obtuvieron las películas, las cuales pudieron ser desprendidas con facilidad de las placas.

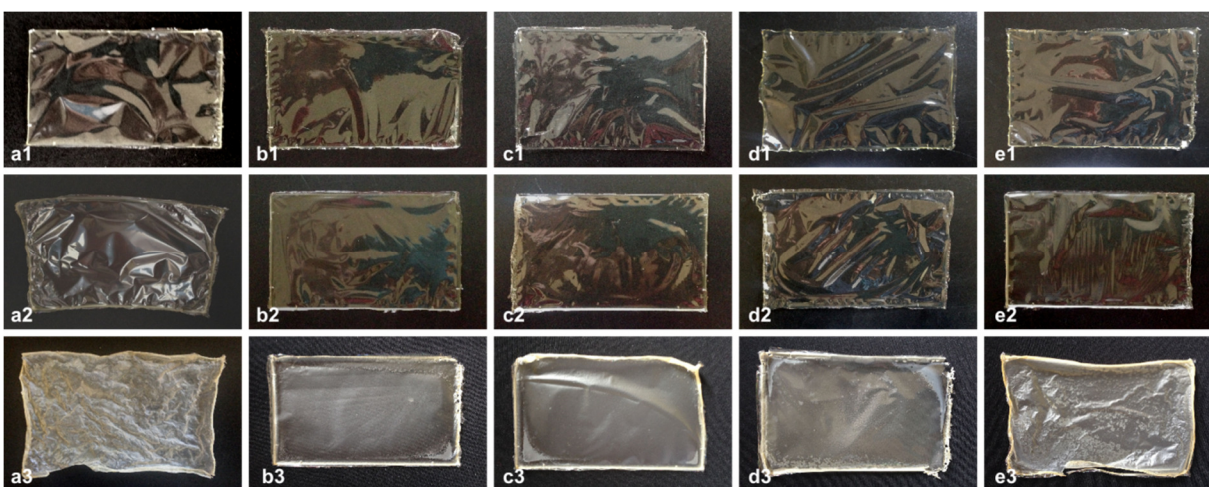


Figura 29. Imágenes de películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.

Las letras indican una relación de masa CS/CMCS diferente en cada fila y los números indican una concentración NIS creciente en cada columna.

Como puede observarse en la **Figura 29**, tanto las películas control (**a1-e1**) como las películas con NIS a 1000 UI/ml (**a2-e2**) fueron visualmente homogéneas, claras, suaves y flexibles. Por el contrario, las películas con NIS a 6000 UI/ml (**a3-e3**) presentaron superficies rugosas e irregulares. Además, al igual que lo observado en 4.4.1, estas películas exhibieron algunas zonas con agregados y con mayor opacidad, lo cual podría estar vinculado a la presencia de cloruro de sodio en Nisaplin[®] (246).

Asimismo, se obtuvieron imágenes por SEM de las superficies (**Figura 30**) y de las secciones transversales (**Figura 31**) de las películas biopoliméricas. En concordancia con lo observado en 4.4.1, la incorporación de NIS a 1000 UI/ml no tuvo efectos notorios en la microestructura de las películas de CS y de las películas compuestas de CS/CMCS. Sin embargo, tanto las superficies como los cortes transversales de las películas conteniendo NIS a 6000 UI/ml mostraron notables alteraciones en su microestructura, confirmando que el agregado de altos contenidos de la bacteriocina interrumpió la matriz conformada por ambos biopolímeros.

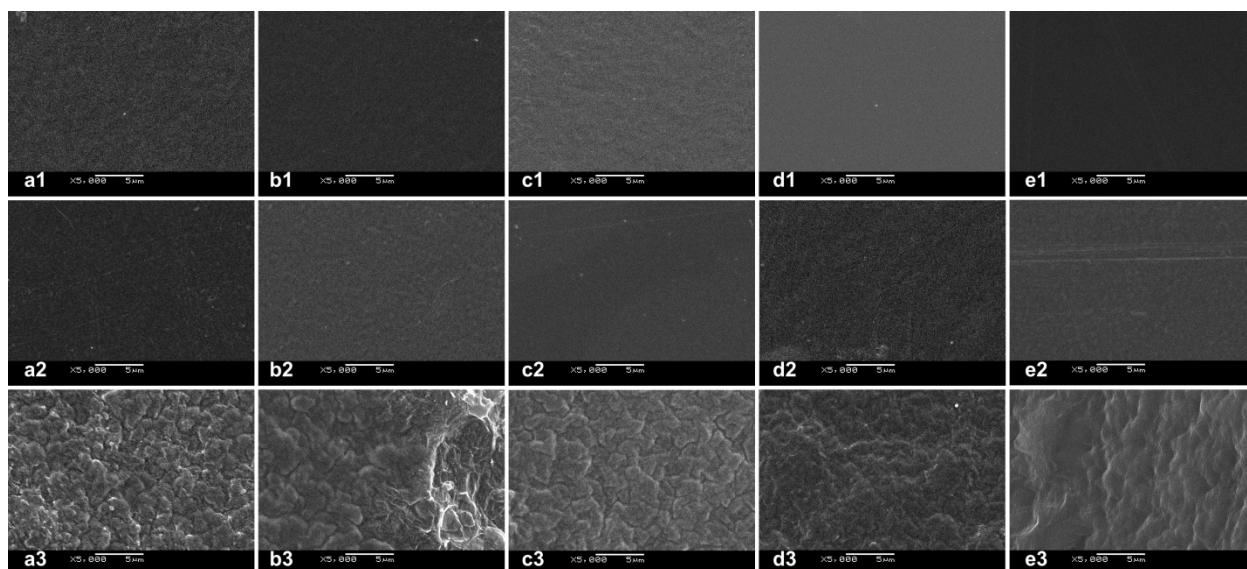


Figura 30. Micrografías obtenidas por SEM de la superficie de las películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a: (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.

Las letras indican una relación de masa CS/CMCS diferente en cada fila y los números indican una concentración NIS creciente en cada columna.

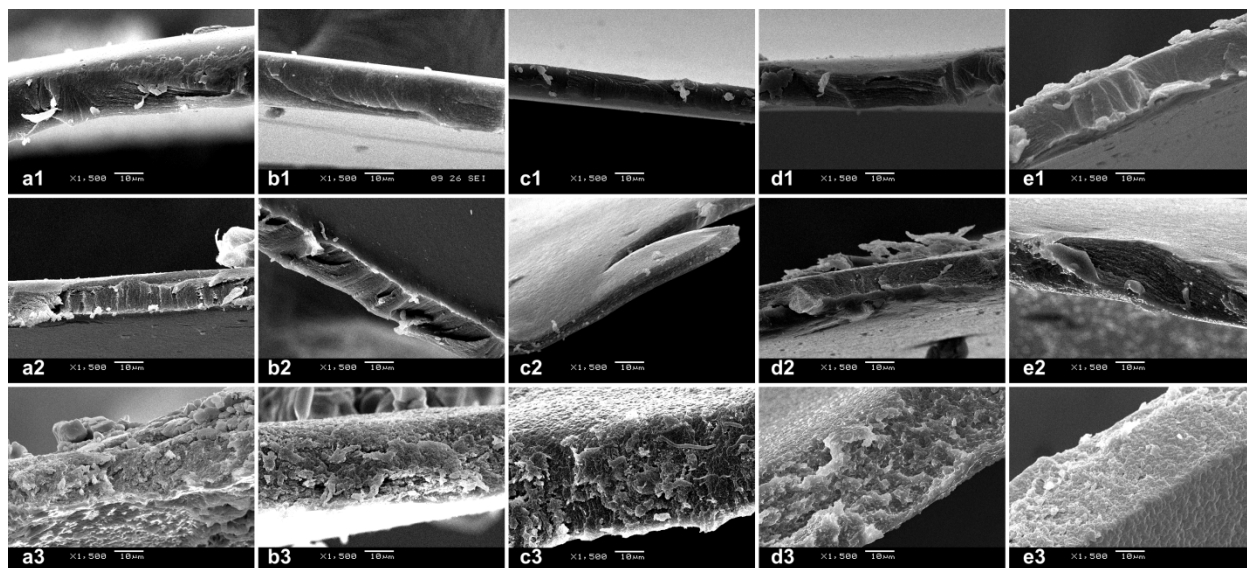


Figura 31. Micrografías obtenidas por SEM de la sección transversal de las películas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a: (1) 0 UI/ml, (2) 1000 UI/ml y (3) 6000 UI/ml.

Las letras indican una relación de masa CS/CMCS diferente en cada fila y los números indican una concentración NIS creciente en cada columna.

4.5.2 Espesor

Los espesores obtenidos variaron entre 0.021 y 0.058 mm para las distintas biopelículas, con valores de SD en línea con estudios anteriores (247).

Como se puede apreciar en la **Tabla 20**, no se observaron diferencias significativas entre los espesores de las películas de CS y los de las películas con diferentes relaciones CS/CMCS (p/p), tanto para las películas control como para aquellas con NIS a 1000 UI/ml. Este resultado indicó que el espesor de las biopelículas no se vio alterado por la presencia de CMCS ni por la de NIS a 1000 UI/ml. Sin embargo, cuando se agregó NIS a 6000 UI/ml, las películas presentaron valores de espesor más elevados. Otras investigaciones también revelaron que el espesor de películas conteniendo NIS fue mayor al incrementar la concentración de péptidos, y esto fue atribuido a un aumento del peso total de las soluciones formadoras de película, así como a la formación de

agregados (20), tal como se observó anteriormente en este trabajo. Asimismo, otros estudios informaron que la presencia de cloruro de sodio en la formulación comercial Nisaplin® condujo a la formación de cristales de sal, aumentando el espesor de las películas con NIS (183,246).

Tabla 20. Espesor de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.

CS/CMCS (p/p)	Espesor (mm) *		
	Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
100/0	0.021 ± 0.003 ^{B, a}	0.026 ± 0.005 ^{B, a}	0.043 ± 0.007 ^{A, b}
95/5	0.023 ± 0.003 ^{B, a}	0.031 ± 0.005 ^{B, a}	0.050 ± 0.009 ^{A, ab}
90/10	0.021 ± 0.002 ^{B, a}	0.029 ± 0.001 ^{B, a}	0.048 ± 0.010 ^{A, ab}
85/15	0.021 ± 0.003 ^{B, a}	0.031 ± 0.005 ^{B, a}	0.058 ± 0.011 ^{A, a}
80/20	0.022 ± 0.004 ^{B, a}	0.029 ± 0.006 ^{B, a}	0.053 ± 0.011 ^{A, ab}

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

4.5.3 Propiedades ópticas

De acuerdo con los resultados mostrados en la **Tabla 21**, las películas control de CS presentaron un grado de opacidad de ca. 2.5%, similar al de las películas con diferentes relaciones de masa CS/CMCS sin NIS. Asimismo, los valores no cambiaron tras la adición del péptido antimicrobiano a 1000 UI/ml para una misma relación de masa CS/CMCS. Sin embargo, la transparencia de las películas fue significativamente menor cuando se agregó NIS a 6000 UI/ml. Estos hallazgos coinciden con otros resultados publicados anteriormente, los cuales demostraron que la incorporación de NIS ocasionó una disminución de la transparencia de las biopelículas (20,174,183). Dicho efecto fue atribuido a la dispersión del péptido antimicrobiano en la matriz del polímero y a la formación de agregados y zonas más opacas, tal como se observó anteriormente en el análisis morfológico de las películas.

Cuando se agregó NIS a 1000 y 6000 UI/ml, los porcentajes de opacidad de las películas compuestas de CS/CMCS fueron significativamente más bajos que los de las películas de CS para el mismo contenido de NIS. Estos resultados sugirieron que la presencia de CMCS tuvo un efecto

en la dispersión de NIS en las matrices biopoliméricas. Es posible que, dado que el péptido cargado positivamente se puede unir a través de interacciones iónicas con grupos cargados negativamente (253) -como grupos carboximetilo del CMCS-, mejorando la dispersión de la NIS, lo que implicaría formación de menos agregados y películas más transparentes.

Tabla 21. Opacidad (A_{600}/mm) de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.

CS/CMCS (p/p)	Opacidad (A_{600}/mm)*		
	Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
100/0	2.49 ± 0.29 ^{B, a}	3.05 ± 0.39 ^{B, a}	16.87 ± 1.51 ^{A, a}
95/5	2.16 ± 0.33 ^{B, a}	1.68 ± 0.07 ^{B, c}	7.23 ± 2.14 ^{A, c}
90/10	2.73 ± 0.29 ^{B, a}	2.23 ± 0.29 ^{B, b}	9.86 ± 1.41 ^{A, bc}
85/15	2.48 ± 0.46 ^{B, a}	2.12 ± 0.21 ^{B, bc}	12.83 ± 1.06 ^{A, bc}
80/20	2.22 ± 0.56 ^{B, a}	2.15 ± 0.26 ^{B, bc}	9.15 ± 2.87 ^{A, b}

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

4.5.4 WVP

Como se puede observar en la **Tabla 22**, el agregado de CMCS en distintas relaciones no presentó diferencias significativas con respecto al valor de WVP de las películas control. En general, los grupos -OH de las moléculas de biopolímeros pueden formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, facilitando así la difusión del vapor de agua a través de la película (254). Dado que los valores de WVP se mantuvieron iguales a pesar de la introducción de los grupos -OH del CMCS, estos grupos podrían estar formando enlaces de hidrógeno con CS según lo reportado anteriormente en otros estudios (214).

Por otra parte, la incorporación de 1000 UI/ml de NIS no afectó la WVP de las películas de CS ni la de las películas compuestas de CS/CMCS. Sin embargo, todas las películas analizadas exhibieron un aumento significativo en WVP luego del agregado del péptido antimicrobiano a 6000 UI/ml. Tal como se discutió en 4.4.4, el aumento de WVP al incorporar NIS en alta

concentración puede estar relacionados con una mayor cantidad de grupos hidrofílicos introducidos por la bacteriocina (177), así como por la interrupción de las interacciones polímero-polímero, la formación de estructuras irregulares y rugosas (174) y el mayor contenido de sal proveniente de Nisaplin® (183). Además, para NIS a 6000 UI/ml, las películas de CS y de CS/CMCS 95/5 (p/p) presentaron un aumento del 50-80% en WVP, mientras que las formulaciones con mayor contenido de CMCS tuvieron un aumento de más de 2 veces para dicho valor. Este aumento podría deberse a la contribución de los grupos hidrófilos de NIS sumados a los del CMCS.

Tabla 22. WVP de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.

CS/CMCS (p/p)	WVP ($\times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)*		
	Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
100/0	3.43 \pm 0.32 ^{B, a}	4.07 \pm 0.68 ^{B, a}	6.35 \pm 0.22 ^{A, c}
95/5	3.93 \pm 0.36 ^{B, a}	4.84 \pm 0.89 ^{B, a}	6.45 \pm 0.55 ^{A, c}
90/10	3.43 \pm 0.89 ^{B, a}	3.78 \pm 0.28 ^{B, a}	7.65 \pm 0.13 ^{A, b}
85/15	2.98 \pm 0.76 ^{B, a}	4.18 \pm 0.11 ^{B, a}	7.71 \pm 0.87 ^{A, b}
80/20	3.65 \pm 0.04 ^{C, a}	4.73 \pm 0.41 ^{B, a}	9.25 \pm 0.19 ^{A, a}

* Promedio \pm SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

4.5.5 Solubilidad en agua

A continuación, se estudió la solubilidad en agua de las biopelículas de CS y CS/CMCS y los resultados se aprecian en la **Tabla 23**. Las películas de CS tuvieron una solubilidad en agua de $16.6 \pm 1.1\%$, similar a los valores de solubilidad informados previamente (215,255). Además, el porcentaje de solubilidad se mantuvo sin cambios conforme aumentaron las concentraciones de CMCS, tanto en ausencia de NIS como con el agregado de NIS a 1000 UI/ml. Sin embargo, la incorporación del péptido en el nivel más alto resultó en un aumento de solubilidad de entre 2-3 veces de los valores de las películas control, alcanzando un valor de $48.9 \pm 1.1\%$ para la película con CS/CMCS 80/20 (p/p). Estos hallazgos fueron consistentes con los resultados de WVP y

también pueden atribuirse a los grupos hidrofílicos contribuidos por la NIS, así como al efecto del contenido de sal presente en el producto comercial, Nisaplin[®].

Tabla 23. Solubilidad en agua de las biopelículas con distintas relaciones de masas CS/CMCS y contenido de NIS.

CS/CMCS (p/p)	Solubilidad (%) [*]		
	Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
100/0	16.6 ± 1.1 ^{B, a}	25.3 ± 2.6 ^{B, a}	37.5 ± 7.4 ^{A, b}
95/5	17.4 ± 1.7 ^{B, a}	22.4 ± 3.2 ^{B, a}	36.8 ± 2.5 ^{A, b}
90/10	15.4 ± 0.6 ^{B, a}	22.1 ± 1.8 ^{B, a}	45.4 ± 5.9 ^{A, ab}
85/15	17.6 ± 0.7 ^{C, a}	25.3 ± 1.4 ^{B, a}	44.2 ± 3.5 ^{A, ab}
80/20	15.3 ± 1.9 ^{C, a}	24.7 ± 0.5 ^{B, a}	48.9 ± 1.1 ^{A, a}

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

4.5.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas control y las películas con NIS se evaluaron mediante la determinación de σ_{max} y ϵ , los cuales se pueden observar en la **Tabla 24**.

Las películas de CS sin NIS presentaron el valor de σ_{max} más alto (29.1 ± 5.4 MPa), el cual disminuyó al aumentar la fracción de CMCS. Por otro lado, las películas compuestas de CS/CMCS sin NIS presentaron porcentajes de ϵ cercanos al 55%, siendo significativamente más altos que los de las películas de CS ($38.2 \pm 6.5\%$). De manera similar, se reportó que en películas compuestas de polipropilenglicol (PPG) y CMCS, los valores de σ_{max} disminuyeron al aumentar la fracción de PPG, probablemente debido al entrelazamiento e interacción de las cadenas de polímero (256). También, otros estudios revelaron que la incorporación de PVA a películas de CS resultó en valores de σ_{max} más bajos y valores de ϵ más altos (249,257). Dado que por lo general los plastificantes disminuyen σ_{max} y aumentan ϵ (258), los cambios observados en el presente estudio sugirieron que el agregado de CMCS tuvo una acción plastificante en las matrices de CS sin NIS. Este efecto podría atribuirse a un proceso interno de plastificación que causó fuerzas

intermoleculares más débiles entre las cadenas del polímero, debido a la voluminosidad de los segmentos CMCS incorporados a la matriz de CS (259). Además, estos resultados respaldan los resultados obtenidos en los ensayos de opacidad (sección 4.5.3), ya que los plastificantes también pueden mejorar la transparencia de la película debido a una mejor capacidad de dispersión de las matrices (183).

Tabla 24. Propiedades mecánicas de las películas con diferentes relaciones de masa CS/CMCS y concentración variable de NIS: esfuerzo máximo (σ_{\max}) y deformación de rotura (ϵ).

Propiedad	CS/CMCS (p/p)	Tratamiento		
		Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
σ_{\max} (MPa)*	100/0	29.1 ± 5.4 ^{A, a}	16.9 ± 5.1 ^{B, a}	11.4 ± 2.0 ^{C, a}
	95/5	21.3 ± 5.6 ^{A, abc}	19.9 ± 7.1 ^{A, a}	7.9 ± 3.7 ^{B, ab}
	90/10	25.4 ± 6.4 ^{A, ab}	20.8 ± 4.3 ^{A, a}	9.2 ± 2.4 ^{B, ab}
	85/15	18.6 ± 6.5 ^{A, bc}	15.8 ± 3.4 ^{A, a}	6.2 ± 1.9 ^{B, b}
	80/20	14.1 ± 5.2 ^{A, c}	17.9 ± 2.5 ^{A, a}	5.9 ± 0.2 ^{B, b}
ϵ (%)*	100/0	38.2 ± 6.5 ^{A, b}	20.1 ± 3.4 ^{B, c}	15.3 ± 6.6 ^{B, a}
	95/5	55.1 ± 6.6 ^{A, a}	43.2 ± 13.7 ^{A, b}	14.1 ± 4.5 ^{B, a}
	90/10	58.4 ± 10.0 ^{A, a}	55.8 ± 6.4 ^{A, ab}	19.8 ± 4.7 ^{B, a}
	85/15	60.5 ± 7.6 ^{A, a}	52.9 ± 14.7 ^{A, a}	12.4 ± 2.3 ^{B, a}
	80/20	56.8 ± 12.7 ^{A, a}	62.5 ± 7.4 ^{A, ab}	12.6 ± 1.6 ^{B, a}

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Si bien las películas control de CS presentaron una reducción significativa en los valores de σ_{\max} y de ϵ al agregar el péptido antimicrobiano a 1000 y 6000 UI/ml, se observó que la incorporación de NIS a 1000 UI/ml no afectó las propiedades mecánicas de las películas compuestas de CS/CMCS. Sin embargo, el agregado de la bacteriocina a 6000 UI/ml tuvo un efecto más notorio

en las propiedades mecánicas y llevó a reducciones del 60-80% de los valores de σ_{\max} y de ϵ , de acuerdo a lo discutido en 4.4.6.

4.5.7 Propiedades térmicas

Se realizaron análisis por DSC para estudiar la estabilidad térmica de las películas. Los resultados se describen en la **Tabla 25** y los termogramas más relevantes se presentan en la **Figura 32**.

Todos los termogramas obtenidos después del primer ciclo de calentamiento presentaron un amplio pico endotérmico centrado en el rango de ca. 55 °C, el cual puede relacionarse con la humedad de las muestras (31,252).

Tabla 25. Temperaturas máximas (T_p) de las películas con diferentes relaciones de masa CS/CMCS y concentraciones variables de NIS, obtenidas por DSC, para proceso endotérmico (primer ciclo de calentamiento, 30-180 °C) y exotérmico (segundo ciclo de calentamiento, 30-320 °C).

Propiedad	CS/CMCS (p/p)	Tratamiento		
		Control	NIS 1000 UI/ml	NIS 6000 UI/ml
T_p endotérmico (°C)*	100/0	55.3 ± 1.5 ^{A, a}	50.9 ± 2.4 ^{A, a}	51.6 ± 5.3 ^{A, a}
	95/5	55.0 ± 8.0 ^{A, a}	52.1 ± 2.5 ^{A, a}	50.2 ± 6.7 ^{A, a}
	90/10	54.8 ± 5.1 ^{A, a}	55.1 ± 8.1 ^{A, a}	47.9 ± 7.6 ^{A, a}
	85/15	54.9 ± 3.5 ^{A, a}	56.7 ± 11.3 ^{A, a}	53.2 ± 9.3 ^{A, a}
	80/20	53.9 ± 8.7 ^{A, a}	59.7 ± 7.3 ^{A, a}	49.2 ± 2.1 ^{A, a}
T_p exotérmico (°C)*	100/0	296.9 ± 1.2 ^{A, a}	292.1 ± 1.7 ^{A, a}	281.6 ± 6.8 ^{B, ab}
	95/5	287.7 ± 0.3 ^{A, b}	291.2 ± 1.8 ^{A, a}	291.1 ± 1.8 ^{A, a}
	90/10	280.3 ± 5.3 ^{B, bc}	283.6 ± 6.2 ^{A, b}	291.1 ± 1.9 ^{A, a}
	85/15	274.4 ± 5.1 ^{A, cd}	274.7 ± 2.4 ^{A, c}	277.7 ± 7.5 ^{A, b}
	80/20	271.6 ± 4.8 ^{B, d}	275.2 ± 1.6 ^{AB, c}	282.5 ± 6.6 ^{A, ab}

* Promedio ± SD (n= 3).

Letras mayúsculas distintas en una fila indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

Letras minúsculas distintas en una columna indican diferencias significativas en los promedios para cada propiedad ($P < 0.05$).

En el segundo ciclo de calentamiento, todas las muestras exhibieron un solo pico exotérmico (T_p) centrado entre 270-300 °C, que puede atribuirse a la despolimerización y descomposición pirolítica del esqueleto del polisacárido (215). No se observó temperatura de transición vítrea,

probablemente porque la descomposición impidió su determinación (252). Para la película de CS, se encontró la T_p del evento exotérmico a 296.9 ± 1.2 °C, y este resultado fue similar a otros resultados publicados anteriormente (215,227,252). Curiosamente, la T_p se corrió a temperaturas menores cuando el contenido de CMCS aumentó, alcanzando el valor más bajo (271.6 ± 4.8 °C) en la muestra de película compuesta de CS/CMCS 80/20 (p/p). Esto concuerda con otros trabajos en los cuales se demostró que las películas compuestas de CS y CMC (227) y de CMCS y PPG (256) presentaron una estabilidad térmica que las películas de los mismos biopolímeros puros, debido a la interrupción y al reordenamiento de las principales cadenas de polímeros por parte de los segmentos de biopolímeros introducidos, siendo necesario aplicar menos energía para su descomposición. Por otra parte, los plastificantes también debilitan la red de polímeros y de hecho, varios autores han reportado que la incorporación de plastificantes disminuyó la T_p de diferentes películas (260–262). Por lo tanto, el efecto plastificante otorgado por el CMCS que se observó en las pruebas mecánicas y en la evaluación de la opacidad realizadas en el presente trabajo, también podría explicar la disminución de la estabilidad térmica observada conforme aumentó el contenido de CMCS.

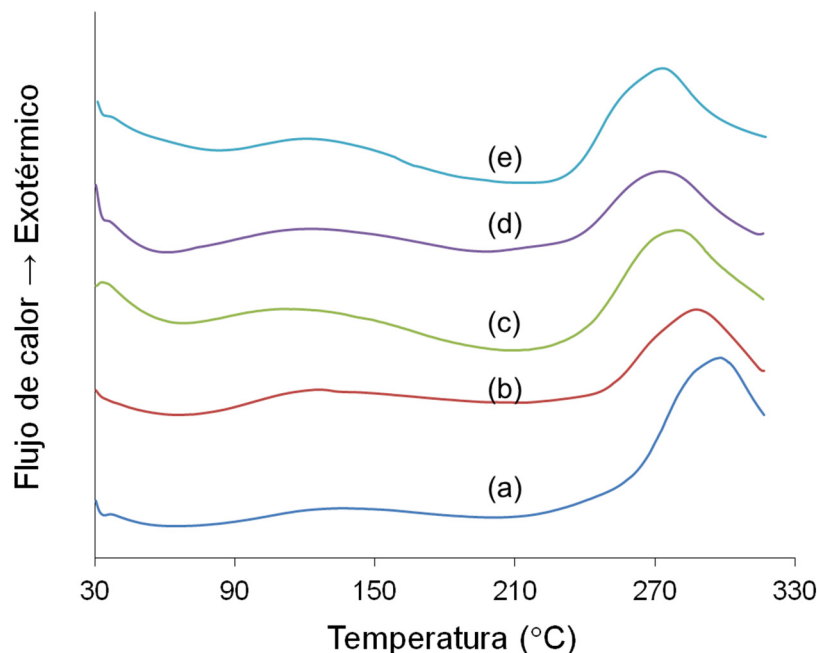


Figura 32. Termogramas obtenidos por DSC (segundo ciclo de calentamiento) de películas con NIS (6000 UI/ml) con relaciones CS/CMCS (p/p) de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p).

Además de esto, la T_p de las películas de CS disminuyó cuando se añadió NIS, lo que indicaría que la incorporación del péptido modificó las propiedades térmicas de las películas, según lo discutido en 4.4.6. Por el contrario, este efecto no se observó en las películas de CS/CMCS e incluso las películas compuestas de CS/CMCS con relación 80/20 (p/p) conteniendo NIS presentaron una T_p más alta que la misma formulación sin el péptido. Según estos resultados, la combinación de CS con CMCS podría haber tenido un efecto en la distribución de NIS dentro de la red de películas, como también se mencionó anteriormente.

4.5.8 XRD

Se realizaron análisis de XRD para comparar los efectos tanto de la mezcla de CMCS con CS y del agregado de NIS sobre las propiedades estructurales de las películas resultantes.

Como se puede apreciar en la **Figura 33a** y **Figura 33b**, la película de CS presentó un pico amplio en ca. $2\theta = 25^\circ$, atribuible a la fase amorfa de la estructura de la película de CS (87). Por el

contrario, las películas control compuestas de CS/CMCS presentaron picos más definidos e intensos, que se desplazaron hacia ángulos ligeramente inferiores a ca. $2\theta = 20^\circ$, sugiriendo que la introducción de CMCS tuvo un efecto en la disposición de las cadenas poliméricas de CS, aumentando el grado de orden. En general, el agregado de plastificantes a polímeros semicristalinos como el CS, conlleva a una disminución de la T_p debido a una disminución de la cristalinidad (261). Sin embargo, varios autores han descrito que los plastificantes aumentan la velocidad de cristalización debido a una mayor movilidad de las cadenas de polímeros (261,263,264) por lo que es posible que la incorporación de CMCS haya aumentado el grado de orden tal como sugieren los resultados aquí presentados.

Como se observa en las **Figura 33c-f**, los difractogramas de las películas incorporadas con NIS presentaron picos más amplios y más aplanados, lo que indicaría que la adición de NIS disminuyó su grado de orden. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que demostraron que la intensidad del patrón de XRD disminuyó tras el agregado de NIS a películas poliméricas (251,265). Asimismo, estos resultados confirmaron que la adición de la bacteriocina condujo a la ruptura de la red de polímeros de las regiones cristalinas de la matriz de la película.

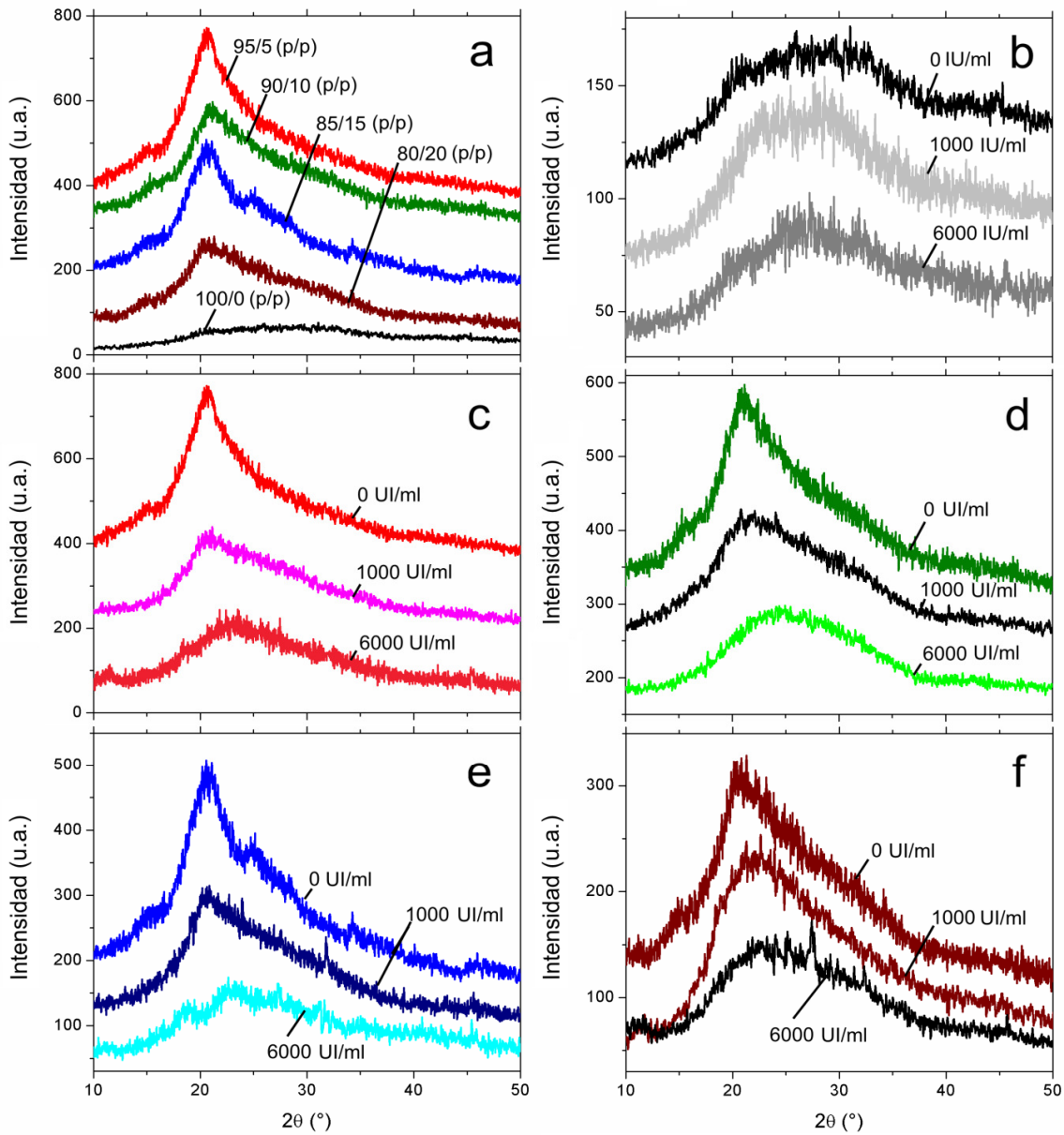


Figura 33. Difractogramas de: (a) películas control con diferentes relaciones de masa CS/CMCS, y de películas incorporadas en NIS con relaciones de masa CS/CMCS de: (b) 100/0, (c) 95/5, (d) 90/10, (e) 85/15 y (f) 80/20 (p/p). Para las películas incorporadas con NIS, se agregó NIS a 1000 y 6000 UI/ml.

4.5.9 Actividad antimicrobiana

Se llevaron a cabo ensayos de difusión en agar para estudiar la actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes* de las películas control y de las películas conteniendo NIS.

Al igual que en el caso de las películas de CS con NIS libre y NIS encapsulada estudiadas previamente en este trabajo, no se observaron zonas de inhibición tanto en las películas control como en las películas que contenían el péptido antimicrobiano en la concentración más baja de 1000 UI/ml. Sin embargo, se observaron zonas de inhibición en las películas compuestas de CS y CS/CMCS con NIS a 6000 UI/ml (**Figura 34**). Estos resultados indicaron que se necesitó aplicar el nivel más alto de NIS para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en las condiciones experimentales de los ensayos.

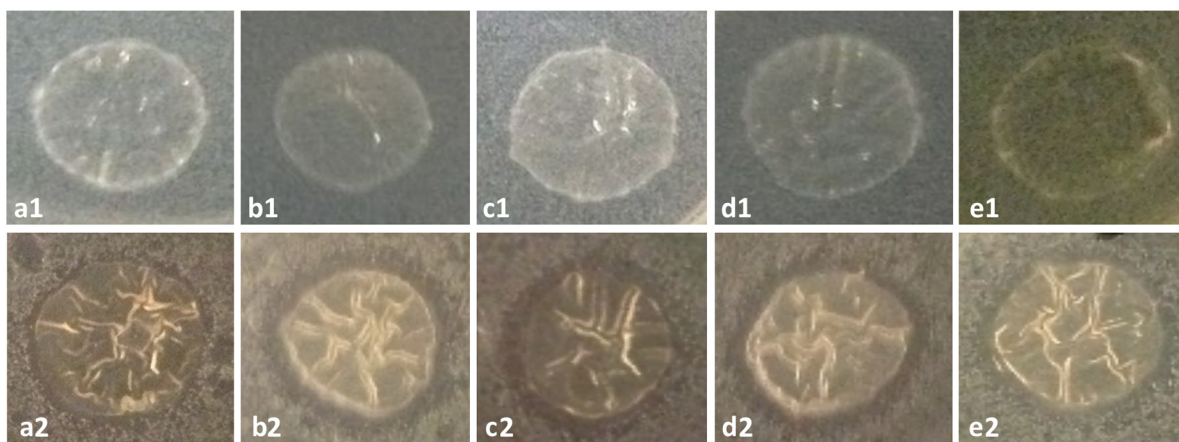


Figura 34. Zonas de inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* en pruebas de difusión en agar de biopelículas con relaciones CS/CMCS de: (a) 100/0, (b) 95/5, (c) 90/10, (d) 85/15 y (e) 80/20 (p/p), conteniendo NIS a (1) 1000 UI/ml y (2) 6000 UI/ml.

Las letras indican relaciones CS/CMCS (p/p) diferentes entre cada fila y los números indican concentración creciente de NIS en cada columna.

Como se muestra en la **Figura 35**, las zonas de inhibición producidas por las películas compuestas de CS/CMCS con NIS a 6000 UI/ml presentaron un diámetro promedio de ca. 15 mm, el cual se mantuvo al incrementar el contenido de CMCS. Por otro lado, las películas de CS con NIS produjeron zonas de inhibición significativamente más pequeñas, lo que sugirió que la actividad

antimicrobiana contra *L. monocytogenes* de dichas películas fue inferior a la de las películas compuestas CS/CMCS.

Estudios anteriores han informado que películas biopoliméricas con NIS, preparadas utilizando biopolímeros hidrófilos, fueron más efectivas contra *L. monocytogenes* que aquellas preparadas con biopolímeros hidrófobos. Esto se debió al carácter anfifílico del péptido y su tendencia a adherirse a las superficies hidrófobas de manera que las superficies hidrófilas mejoraron tanto la liberación como la solubilidad en agua de NIS, mejorando la actividad antimicrobiana de las películas (179,180,266). Por lo tanto, la mayor actividad antibacteriana observada en las películas compuestas CS/CMCS podría atribuirse a la introducción de grupos carboximetilo hidrofílicos que posiblemente condujeron a una mayor difusión de la NIS en agar, así como a una mejor solubilidad en agua de las películas CMCS/CS con NIS, tal como se describió en las pruebas de solubilidad del presente trabajo.

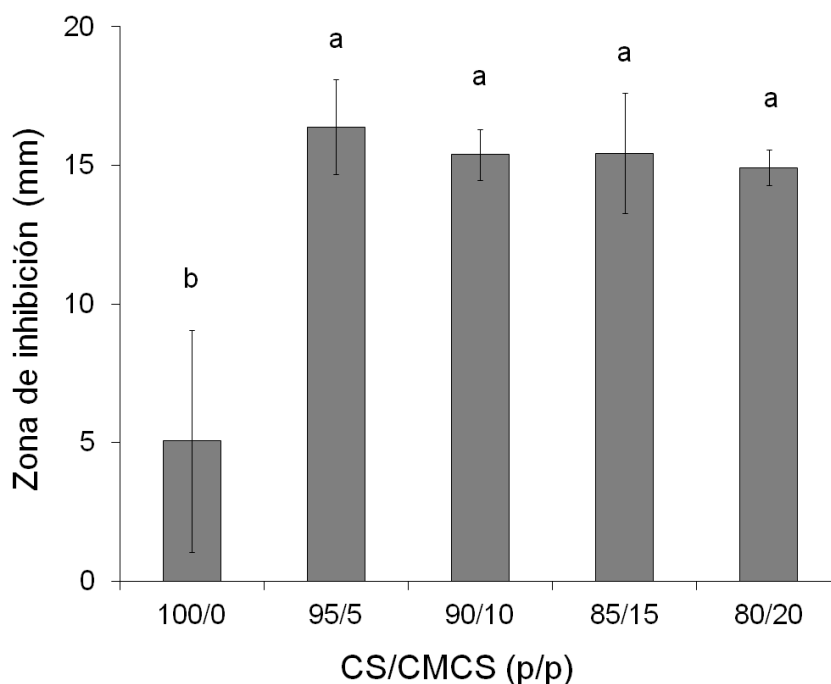


Figura 35. Diámetro de las zonas de inhibición de las películas conteniendo NIS (6000 UI/ml) con relaciones CS/CMCS de 100/0, 95/5, 90/10, 85/15 y 80/20 (p/p).

4.5.10 Evaluación cualitativa

A modo de tener una primera aproximación sobre la factibilidad de aplicación de las películas obtenidas, se recubrieron trozos de carne con películas de CS, CMCS y CS/CMCS para evaluar cualitativamente el comportamiento del recubrimiento. Los trozos envueltos fueron almacenados a 4 °C durante 21 días.

Tal como se observa en la **Figura 36**, todas las películas se mantuvieron íntegras, sin degradación apreciable luego de su almacenamiento en refrigeración por 21 días. Por lo tanto, estas observaciones sugirieron que las películas desarrolladas en el presente trabajo podrían ser potencialmente utilizadas para el envasado de alimentos, incluso aquellos con alto porcentaje de humedad como la carne.

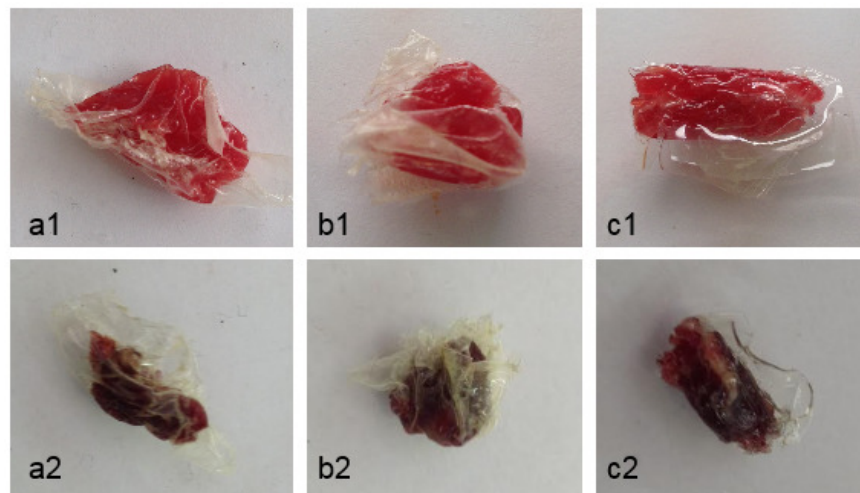


Figura 36. Películas comestibles aplicadas a trozos de carne, elaboradas con: (a) CS, (b) CS y CMCS, (c) CMCS, donde (1) corresponde a t=0 y (2) corresponde a t=21 días.

5 CONCLUSIONES

En la primera etapa del trabajo se estudió la formación de nanopartículas para encapsular NIS (proveniente del preparado comercial Nisaplin®) mediante gelación iónica de CS con TPP. Se determinaron los rangos de concentraciones necesarias para la formación de nanopartículas, obteniéndose nanopartículas CS/TPP estables. Sin embargo, dicho sistema no logró encapsular a la bacteriocina, por lo que se modificó el sistema de encapsulación utilizando ALG, un biopolímero aniónico, que podría interactuar con la NIS catiónica. De esa manera, se estudió la formación de nanopartículas de ALG/CS conteniendo NIS, preparadas por gelación iónica de ALG y posterior complejación con CS. Para optimizar y estudiar los efectos de los parámetros de formulación en las propiedades de dicho sistema, se utilizó un diseño experimental de Box-Behnken y RSM. La formulación optimizada presentó una EE de $36.1 \pm 0.6\%$, un tamaño de partícula de 66.4 ± 8.9 nm y una buena estabilidad coloidal, indicada por un valor de potencial zeta de -31.7 ± 2.6 mV. Además, la aplicación de dichas herramientas de diseño experimental sugirió que la encapsulación fue favorecida principalmente por las interacciones Nisaplin® y ALG, mientras que el contenido de CS tuvo un efecto importante en el tamaño de las nanopartículas y la estabilidad coloidal. Los análisis de morfología confirmaron el tamaño de las nanopartículas encontrado por DLS y se demostró la existencia de interacciones iónicas entre NIS, CS ALG mediante espectroscopía Raman, describiéndose por primera vez el espectro Raman para NIS. Con respecto a su actividad antimicrobiana, las nanopartículas cargadas con NIS no solo retrasaron el crecimiento de *L. monocytogenes* sino que también mostraron una actividad sostenida a lo largo del tiempo, tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos en carne vacuna. Estos hallazgos sugirieron que la aplicación de nanopartículas conteniendo NIS permitiría utilizar concentraciones de NIS más bajas respecto a la que se requeriría si ésta estuviera sin encapsular, para obtener el mismo efecto antibacteriano en carne vacuna y, por lo tanto, dichas nanopartículas presentan una potencial aplicación en la industria alimentaria como un agente biopreservante de carne vacuna, refrigerada y envasada al vacío.

En la segunda etapa de esta investigación, se estudió la incorporación de las nanopartículas desarrolladas previamente (de ALG/CS conteniendo NIS) a películas de CS. Para eso, se

prepararon y caracterizaron biopelículas de CS y de CS con agregado de NIS libre y con NIS encapsulada. La incorporación del péptido sin encapsular afectó negativamente el aspecto visual de las películas de CS, produciendo películas no homogéneas con zonas más opacas y de mayor rigidez en comparación a las películas control y a las películas conteniendo nanopartículas de NIS. Los ensayos realizados por espectrofotometría confirmaron una mayor opacidad de las películas con NIS libre y los análisis por DSC sugirieron que las mismas tuvieron una menor estabilidad térmica que las películas con nanopartículas. Además, se observó que la incorporación de NIS encapsulada tuvo un efecto menor en los valores de WVP y solubilidad que la NIS libre, posiblemente debido a una menor exposición de los grupos hidrofílicos de la NIS por el proceso de nanoencapsulación. Por otra parte, la incorporación de NIS libre resultó en un efecto negativo sobre las propiedades mecánicas de la película de CS, disminuyendo los valores de σ_{max} y ϵ (%), y que la incorporación de la NIS encapsulada logró disminuir este efecto negativo. Las películas con NIS libre exhibieron una menor estabilidad térmica en los análisis por DSC, y los ensayos por XRD mostraron que la encapsulación mejoró el grado de orden cuando se utilizó una alta concentración de NIS. Sin embargo, los ensayos de actividad antimicrobiana no demostraron actividad antibacteriana por parte de las biopelículas con nanopartículas de NIS, mientras que las películas con NIS sin encapsular exhibieron halo de inhibición. Por lo tanto, a pesar de que la incorporación de nanopartículas de NIS a películas de CS mejoró su aspecto visual y sus propiedades físico-químicas en comparación con las biopelículas con la bacteriocina libre, no se obtuvo el efecto antimicrobiano deseado, posiblemente debido a que la nanoencapsulación retrasó la liberación de la NIS en las condiciones estudiadas.

Es así que en la última etapa del presente trabajo se investigó una nueva alternativa para mejorar la actividad antibacteriana de las películas de CS con NIS sin encapsular. Con ese fin, se estudiaron biopelículas preparadas utilizando CS, CMCS y NIS libre. La combinación de CMCS con CS no alteró la estructura, el grosor, la transparencia y la sensibilidad al agua de las películas en comparación con las películas de CS con el mismo nivel de NIS. La incorporación de CMCS en la formulación de las biopelículas ocasionó cambios en las propiedades mecánicas como ser mayor valor de ϵ y menores valores de σ_{max} . Asimismo, las películas compuestas presentaron una estabilidad térmica más baja, lo que, sumado a los efectos observados en las propiedades mecánicas, sugirió

que el CMCS tuvo un efecto plastificante sobre las películas de CS. Además, los resultados obtenidos sugirieron que la presencia de CMCS mejoró la dispersión de la bacteriocina en la matriz biopolimérica y por tanto a las propiedades físico-químicas de las películas. Luego, se realizaron pruebas de difusión en agar para evaluar la actividad antimicrobiana de las películas contra *L. monocytogenes* y estos ensayos indicaron que las películas compuestas CS/CMCS presentaron una mayor inhibición del crecimiento microbiano en comparación a las películas de CS, probablemente debido a una mejor difusión y solubilidad de la NIS en presencia de grupos más hidrófilos aportados por el CMCS. Por último, se observó que la integridad de las películas se mantuvo al envolver trozos de carne almacenados a 4 °C por 21 días.

En conclusión, se desarrollaron dos sistemas que presentaron propiedades promisorias para mejorar la vida útil de alimentos, orientados a su aplicación en carne vacuna. Por una parte, el sistema nanométrico ALG/CS con NIS, el cual demostró poder ser aplicado de forma directa en productos cárnicos, sin que sea necesaria su incorporación a un envase, con una actividad antimicrobiana en carne superior a la de la bacteriocina sin encapsular. Por otra parte, la incorporación de CMCS a películas de CS con NIS, tuvo un efecto positivo en las propiedades físico-químicas y favoreció la actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* de las películas, ofreciendo ventajas a la hora de diseñar biopelículas con potencial acción antimicrobiana de aplicación en envasado de alimentos.

6 PERSPECTIVAS

De acuerdo a lo observado en la presente investigación, la incorporación de NIS en altas concentraciones tuvo efectos indeseados tanto en el aspecto como en las propiedades físico-químicas de las biopelículas de CS.

Para obtener soluciones formadoras de películas más uniformes y estables, recientemente se ha comenzado a utilizar la homogenización por altas presiones (HPH, por sus siglas en inglés). El pasaje del producto líquido a muy alta presión a través de una válvula especialmente diseñada con apertura variable, llamada válvula de homogeneización, permite romper pequeñas partículas dispersas en el orden de micrones y nanómetros. Además de facilitar la obtención de dispersiones homogéneas, los cambios conformacionales en las cadenas biopoliméricas resultantes de la HPH pueden ocasionar modificaciones en el número de grupos cargados en los polímeros (267), lo que a su vez puede llevar a distintas interacciones entre el biopolímero y la NIS, posiblemente modulando la liberación de dicho péptido. Además, es una técnica sencilla de utilizar y no requiere de la utilización de solventes peligrosos.

Debido a estas razones, se ha comenzado a estudiar la incorporación de NIS a biopelículas de CS con posterior aplicación de HPH como continuación de la investigación descrita en este trabajo. Se planea analizar las propiedades físico-químicas de las películas resultantes y evaluar los efectos de la aplicación de HPH en comparación con otras tecnologías de homogenización.

Asimismo, el conocimiento y know-how desarrollado en este trabajo ha permitido sentar las bases en el grupo de trabajo al cual pertenece la autora de esta investigación, para continuar estudiando este tipo de películas biopoliméricas bioactivas. Esto permitiría ampliar el rango de aplicaciones, sumando nuevas estrategias preparativas (tales como HPH o técnicas de electrospinning y electrospraying) e incorporar nuevos agentes funcionales como ser antimicrobianos, antioxidantes, para estudiar su actividad y posibles sinergias.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Food Packaging Market Worth \$411.3 Billion By 2025 | CAGR: 5.1% [Internet]. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-food-packaging-market>
2. Marsh K, Bugusu B. Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *J Food Sci*. 2007 Apr 1;72(3):R39–55.
3. Rhim J-W, Park H-M, Ha C-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Bionanocomposites Green Plast Biomed Appl*. 2013 Oct 1;38(10):1629–52.
4. Crouvisier-Urien K, Lagorce-Tachon A, Lauquin C, Winckler P, Tongdeesoontorn W, Domenek S, et al. Impact of the homogenization process on the structure and antioxidant properties of chitosan-lignin composite films. *Spec Issue 9th Int Conf Water Food*. 2017 Dec 1;236:120–6.
5. Peelman N, Ragaert P, De Meulenaer B, Adons D, Peeters R, Cardon L, et al. Application of bioplastics for food packaging. *Trends Food Sci Technol*. 2013 Aug;32(2):128–41.
6. Cha DS, Chinnan MS. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(4):223–37.
7. Bernela M, Kaur P, Chopra M, Thakur R. Synthesis, characterization of nisin loaded alginate–chitosan–pluronic composite nanoparticles and evaluation against microbes. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. (0). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814003508>
8. Zaritzky N. Edible Coatings to Improve Food Quality and Safety. In: Aguilera JM, Simpson R, Welte-Chanes J, Bermudez-Aguirre D, Barbosa-Canovas G, editors. *Food Engineering Interfaces*. Springer New York; 2011. p. 631–59.
9. Saavedra H. N, Algecira E. NA. Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. *Nova Publ Cient*. 2010 Apr 11;8(14):171–82.
10. Gharsallaoui A, Joly C, Oulahal N, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 2: Antimicrobial Polymer Materials Containing Nisin. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Jun 10;56(8):1275–89.
11. Silvestre C, Duraccio D, Cimmino S. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog Polym Sci*. 2011 Dec;36(12):1766–82.
12. Irkin R, Esmer OK. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *J Food Sci Technol*. 2015 Oct;52(10):6095–111.
13. Jovanović GD, Klaus AS, Nikšić MP. Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Rev Argent Microbiol*. 2016 Apr;48(2):128–36.
14. Neetoo H, Ye M, Chen H. Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets. *Int J Food Microbiol*. 2010 Jan 1;136(3):326–31.
15. Muppalla SR, Kanatt SR, Chawla SP, Sharma A. Carboxymethyl cellulose–polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. *Food Packag Shelf Life*. 2014 Dec;2(2):51–8.

16. Kakaei S, Shahbazi Y. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT - Food Sci Technol*. 2016 Oct;72:432–8.
17. Marcos B, Aymerich T, Monfort JM, Garriga M. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiol*. 2008 Feb;25(1):177–82.
18. Nguyen VT, Gidley MJ, Dykes GA. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol*. 2008 May;25(3):471–8.
19. Zinoviadou KG, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging Systems: Physical Properties and Function. In: *Bioactive Food Packaging: Strategies, Quality, Safety*. 2016. p. 237–90.
20. Martins JT, Cerqueira MA, Souza BWS, Carmo Avides M do, Vicente AA. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem*. 2010 Feb 10;58(3):1884–91.
21. Song HY, Shin YJ, Song KB. Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *J Food Eng*. 2012 Dec;113(4):541–7.
22. Lu F, Ding Y, Ye X, Liu D. Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Sci Technol*. 2010 Nov;43(9):1331–5.
23. Juck G, Neetoo H, Chen H. Application of an active alginate coating to control the growth of *Listeria monocytogenes* on poached and deli turkey products. *Int J Food Microbiol*. 2010 Sep 1;142(3):302–8.
24. Cao-Hoang L, Grégoire L, Chaine A, Waché Y. Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films. *Food Control*. 2010 Sep;21(9):1227–33.
25. Millette M, Le Tien C, Smoragiewicz W, Lacroix M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Breakdown Food Saf*. 2007 Jul;18(7):878–84.
26. Cao-Hoang L, Chaine A, Grégoire L, Waché Y. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiol*. 2010 Oct;27(7):940–4.
27. de Azeredo HMC. Antimicrobial nanostructures in food packaging. *Trends Food Sci Technol*. 2013 Mar;30(1):56–69.
28. CHA DS, CHINNAN MS. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004 Jul 1;44(4):223–37.
29. Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocoll*. 2015 Feb;44:172–82.
30. Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chem*. 2016 Mar 1;194:1266–74.
31. Yang W, Owczarek JS, Fortunati E, Kozanecki M, Mazzaglia A, Balestra GM, et al. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. *Ind Crops Prod*. 2016 Dec 30;94:800–11.

32. Hashemi Gahruei H, Ziaee E, Eskandari MH, Hosseini SMH. Characterization of basil seed gum-based edible films incorporated with *Zataria multiflora* essential oil nanoemulsion. *Carbohydr Polym.* 2017 Jun 15;166:93–103.
33. Chang PR, Jian R, Yu J, Ma X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. *Food Chem.* 2010 Jun 1;120(3):736–40.
34. Acevedo-Fani A, Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Martín-Belloso O. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocoll.* 2015 May 1;47:168–77.
35. Alexandre EMC, Lourenço RV, Bittante AMQB, Moraes ICF, Sobral PJ do A. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. *Food Packag Shelf Life.* 2016 Dec 1;10:87–96.
36. Chen H, Hu X, Chen E, Wu S, McClements DJ, Liu S, et al. Preparation, characterization, and properties of chitosan films with cinnamaldehyde nanoemulsions. *Food Hydrocoll.* 2016 Dec 1;61:662–71.
37. Tastan Ö, Ferrari G, Baysal T, Donsi F. Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions. *Food Hydrocoll.* 2016 Dec 1;61:756–71.
38. Donsi F, Marchese E, Maresca P, Pataro G, Vu KD, Salmieri S, et al. Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. *Postharvest Biol Technol.* 2015 Aug 1;106:21–32.
39. Pérez-Córdoba LJ, Norton IT, Batchelor HK, Gkatzionis K, Spyropoulos F, Sobral PJA. Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocoll.* 2018 Jun 1;79:544–59.
40. Pérez Córdoba LJ, Sobral PJA. Physical and antioxidant properties of films based on gelatin, gelatin-chitosan or gelatin-sodium caseinate blends loaded with nanoemulsified active compounds. *Responsible Res Innov Food Value Chain.* 2017 Nov 1;213:47–53.
41. Ghani S, Barzegar H, Noshad M, Hojjati M. The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. *Int J Biol Macromol.* 2018 Jun 1;112:197–202.
42. Youssef AhmedM, EL-Sayed SM, EL-Sayed HS, Salama HH, Dufresne A. Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/carboxymethyl cellulose/zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydr Polym.* 2016 Oct 20;151:9–19.
43. Orsuwan A, Sothornvit R. Development and characterization of banana flour film incorporated with montmorillonite and banana starch nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2017 Oct 15;174:235–42.
44. Kundu S, Das A, Basu A, Abdullah MdF, Mukherjee A. Guar gum benzoate nanoparticle reinforced gelatin films for enhanced thermal insulation, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydr Polym.* 2017 Aug 15;170:89–98.
45. de Moura MR, Aouada FA, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *J Food Eng.* 2009 Jun;92(4):448–53.

46. Boelter JF, Brandelli A. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776516304179>
47. Imran M, Revol-Junelles A-M, René N, Jamshidian M, Akhtar MJ, Arab-Tehrany E, et al. Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocoll.* 2012 Dec;29(2):407–19.
48. Huq T, Salmieri S, Khan A, Khan RA, Le Tien C, Riedl B, et al. Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film. *Carbohydr Polym.* 2012 Nov 6;90(4):1757–63.
49. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006 Jul;31(7):603–32.
50. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000 Nov;46(1):1–27.
51. Kaloti M, Bohidar HB. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Nov 1;81(1):165–73.
52. Shukla SK, Mishra AK, Arotiba OA, Mamba BB. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *Int J Biol Macromol.* 2013 Aug;59(0):46–58.
53. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 2009 Jul 1;34(7):641–78.
54. Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Sci Technol.* 2010 Jul;43(6):837–42.
55. Ma Z, Garrido-Maestu A, Jeong KC. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydr Polym.* 2017 Nov 15;176(Supplement C):257–65.
56. Bellich B, D'Agostino I, Semeraro S, Gamini A, Cesaro A. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Mar Drugs.* 2016 May 17;14(5).
57. Abreu FR de, Campana-Filho SP. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. *Polímeros.* 2005;15:79–83.
58. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci.* 1997 Jan 3;63(1):125–32.
59. López-León T, Carvalho ELS, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J Colloid Interface Sci.* 2005 Mar 15;283(2):344–51.
60. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012 Feb 1;90(0):21–7.
61. Hamman JH. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Mar Drugs.* 2010;8(4):1305–22.
62. Kaloti M, Bohidar HB. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Nov 1;81(1):165–73.

63. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int J Pharm.* 2005 May 13;295(1–2):235–45.
64. Dyer AM, Hinchcliffe M, Watts P, Castile J, Jabbal-Gill I, Nankervis R, et al. Nasal Delivery of Insulin Using Novel Chitosan Based Formulations: A Comparative Study in Two Animal Models Between Simple Chitosan Formulations and Chitosan Nanoparticles. *Pharm Res.* 2002 Jul 1;19(7):998–1008.
65. Rodrigues S, Costa AMR da, Grenha A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr Polym.* 2012 Jun 5;89(1):282–9.
66. Abdel-Hafez SM, Hathout RM, Sammour OA. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. *Int J Biol Macromol.* 2014 Mar;64(0):334–40.
67. de Pinho Neves AL, Milioli CC, Müller L, Riella HG, Kuhnen NC, Stulzer HK. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2014 Mar 20;445(0):34–9.
68. Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Nanoparticulate Syst Improv Drug Deliv.* 2001 Mar 23;47(1):83–97.
69. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 2009 Jun 15;114(4):1173–82.
70. Miteluț AC, Tănase EE, Popa VI, Popa ME. Sustainable alternative for food packaging: chitosan biopolymer- a review. *AgroLife Sci J.* 2015;4(2):52–61.
71. Elsabee MZ, Abdou ES. Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng C.* 2013 May 1;33(4):1819–41.
72. Beverly RL, Janes ME, Prinyawiwatkul W, No HK. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2008 May;25(3):534–7.
73. Guo M, Jin TZ, Wang L, Scullen OJ, Sommers CH. Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control.* 2014 Jun;40(0):64–70.
74. Dehnad D, Mirzaei H, Emam-Djomeh Z, Jafari S-M, Dadashi S. Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydr Polym.* 2014 Aug 30;109:148–54.
75. Di Pierro P, Sorrentino A, Mariniello L, Giosafatto CVL, Porta R. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Sci Technol.* 2011 Dec 1;44(10):2324–7.
76. Fernández-Saiz P, Sánchez G, Soler C, Lagaron JM, Ocio MJ. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. *Food Control.* 2013 Nov 1;34(1):61–8.
77. Higuera L, López-Carballo G, Hernández-Muñoz P, Catalá R, Gavara R. Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. *Int J Food Microbiol.* 2014 Oct 1;188:53–9.
78. Katugampola P, Winstead C, Adeleke A. Thermal stability of carboxymethyl chitosan varying the degree of substitution. *Int J Pharm Sci Invent.* 2014 May;3(5):42–8.

79. Bukzem AL, Signini R, dos Santos DM, Lião LM, Ascheri DPR. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. *Int J Biol Macromol*. 2016 Apr 1;85:615–24.
80. Chen X-G, Park H-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydr Polym*. 2003 Sep 1;53(4):355–9.
81. Shariatnia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec 1;120:1406–19.
82. Miranda MES, Marcolla C, Rodrigues CA, Wilhelm HM, Sierakowski MR, Bresolin TMB, et al. Chitosan and N-carboxymethylchitosan: I. The role of N-carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dynamic mechanical properties of its films. *Polym Int*. 2006 Aug 1;55(8):961–9.
83. Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. *Mater Sci Eng C*. 2017 Aug 1;77:1349–62.
84. Suriyatem R, Auras RA, Rachtanapun P. Improvement of mechanical properties and thermal stability of biodegradable rice starch-based films blended with carboxymethyl chitosan. *Ind Crops Prod*. 2018 Oct 15;122:37–48.
85. Suriyatem R, Auras AR, Rachtanapun C, Rachtanapun P. Biodegradable Rice Starch/Carboxymethyl Chitosan Films with Added Propolis Extract for Potential Use as Active Food Packaging. *Polymers*. 2018;10(9).
86. Qiu M, Wu C, Ren G, Liang X, Wang X, Huang J. Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus. *Food Chem*. 2014 Jul 15;155:105–11.
87. Wu J, Zhong F, Li Y, Shoemaker CF, Xia W. Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocoll*. 2013 Jan;30(1):82–91.
88. Lamim R, de Freitas RA, Rudek EI, Wilhelm HM, Cavalcanti OA, Bresolin TMB. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: effect of plasticizers on their physicochemical properties. *Polym Int*. 2006 Aug 1;55(8):970–7.
89. Wang L-C, Chen X-G, Yu L-J, Li P-W. Controlled drug release through carboxymethyl-chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films. *Polym Eng Sci*. 2007 Aug 1;47(9):1373–9.
90. Wang L-C, Chen X-G, Zhong D-Y, Xu Q-C. Study on poly(vinyl alcohol)/carboxymethyl-chitosan blend film as local drug delivery system. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Jun;18(6):1125–33.
91. Guo B, Yuan J, Gao Q. pH and ionic sensitive chitosan/carboxymethyl chitosan IPN complex films for the controlled release of coenzyme A. *Colloid Polym Sci*. 2008;286(2):175–81.
92. Zhao XH, He XW, Xie SQ, Yang LS. Preparation and Properties of Sodium Carboxymethyl Cellulose-Hyaluronic Acid-Carboxymethyl Chitosan Blend. *Appl Mech Mater*. 2010;20–23:1157–61.
93. Martins P, Daga M, Zandonai CF, Grandi BS, Cruz AB, Lucinda Silva RM, et al. Release of tetracycline from O-carboxymethylchitosan films. *Pharm Dev Technol*. 2011 Apr 1;16(2):179–86.
94. Dayarian S, Zamani A, Moheb A, Masoomi M. Physico-Mechanical Properties of Films of Chitosan, Carboxymethyl Chitosan, and Their Blends. *J Polym Environ*. 2014;22(3):409–16.
95. Yin M, Lin X, Ren T, Li Z, Ren X, Huang T-S. Cytocompatible quaternized carboxymethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) blend film loaded copper for antibacterial application. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec 1;120:992–8.

96. Wongpanit P, Sanchavanakit N, Pavasant P, Supaphol P, Tokura S, Rujiravanit R. Preparation and characterization of microwave-treated carboxymethyl chitin and carboxymethyl chitosan films for potential use in wound care application. *Macromol Biosci*. 2005 Oct 20;5(10):1001–12.
97. Zhu G-Q, Wang F-G, Liu Y-Y, Gao Q-C. Properties of water-soluble carboxymethyl chitosan film modified by hydrophobic poly(propylene glycol). *Chem Pap*. 2013;67(4):423–8.
98. Hastuti B, Mudasir M, Siswanta D, Triyono. The Synthesis of Carboxymethyl Chitosan-Pectin Film as Adsorbent for Lead (II) Metal. 2013. 349 p.
99. Paques JP, van der Linden E, van Rijn CJM, Sagis LMC. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014 Jul;209:163–71.
100. Li X, Xie H, Lin J, Xie W, Ma X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polym Degrad Stab*. 2009 Jan;94(1):1–6.
101. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Most Cited Pap Hist Adv Drug Deliv Rev Tribute 25th Anniv J*. 2012 Dec;64, Supplement:194–205.
102. Rajaonarivony M, Vauthier C, Couarraze G, Puisieux F, Couvreur P. Development of a new drug carrier made from alginate. *J Pharm Sci*. 1993 Sep;82(9):912–7.
103. Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydr Polym*. 2008 Nov 21;74(4):813–21.
104. Loquercio A, Castell-Perez E, Gomes C, Moreira RG. Preparation of Chitosan-Alginate Nanoparticles for Trans-cinnamaldehyde Entrapment. *J Food Sci*. 2015 Oct 1;80(10):N2305–15.
105. Wasupalli GK, Verma D. Molecular interactions in self-assembled nano-structures of chitosan-sodium alginate based polyelectrolyte complexes. *Int J Biol Macromol*. 2018 Jul 15;114:10–7.
106. Simsek-Ege FA, Bond GM, Stringer J. Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. *J Appl Polym Sci*. 2003 Apr 11;88(2):346–51.
107. Sarmento B, Ferreira D, Veiga F, Ribeiro A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr Polym*. 2006 Oct 5;66(1):1–7.
108. Zohri M, Nomani A, Gazori T, Haririan I, Mirdamadi SS, Sadjadi SK, et al. Characterization of Chitosan/Alginate Self-Assembled Nanoparticles as a Protein Carrier. *J Dispers Sci Technol*. 2011 Mar 23;32(4):576–82.
109. Azevedo MA, Bourbon AI, Vicente AA, Cerqueira MA. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *Spec Issue Biodegrad Biopolym*. 2014 Nov 1;71:141–6.
110. Natrajan D, Srinivasan S, Sundar K, Ravindran A. Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules. *J Food Drug Anal [Internet]*. [cited 2015 Mar 9]; Available from: [http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498\(15\)00022-8/abstract](http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498(15)00022-8/abstract)
111. Liu J, Xiao J, Li F, Shi Y, Li D, Huang Q. Chitosan-sodium alginate nanoparticle as a delivery system for ϵ -polylysine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. *Food Control*. 2018 Sep 1;91:302–10.
112. Wu T, Li Y, Shen N, Yuan C, Hu Y. Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme. *J Food Eng*. 2018 Sep 1;233:109–16.

113. Chandrasekar V, Coupland JN, Anantheswaran RC. Characterization of nisin containing chitosan-alginate microparticles. *Food Hydrocoll.* 2017 Aug;69:301–7.
114. Zohri M, Alavidjeh M, Haririan I, Ardestani M, Ebrahimi S, Sani H, et al. A Comparative Study Between the Antibacterial Effect of Nisin and Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Raw and Pasteurized Milk Samples. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2010 Dec 1;2(4):258–66.
115. Zohri M, Shafiee Alavidjeh M, Mirdamadi SS, Behmadi H, Hossaini Nasr SM, Eshghi Gonbaki S, et al. Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles: A Hopeful Hybrid Biopreservative. *J Food Saf.* 2013 Feb 1;33(1):40–9.
116. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. 4th NIZO Dairy Conf - Prospects Health Well- Saf 4th NIZO Dairy Conf - Prospects Health Well- Saf. 2006 Sep;16(9):1058–71.
117. Rollema HS, Kuipers OP, Both P, Vos WM de, Siezen RJ. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiology.* 1995;61:2873–8.
118. Miserendino T, Demirci A, Pongtharangkul T. Nisin Production by Immobilized Microbial Cell Culture during Batch and Fed-Batch Fermentations with Various pH Profiles. *Agric Eng Int.* 2008;X.
119. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016 Jun 10;56(8):1262–74.
120. Oppedijk SF, Martin NI, Breukink E. Hit 'em where it hurts: The growing and structurally diverse family of peptides that target lipid-II. *Antimicrob Pept Cell Membr Microb Surf Interact.* 2016 May;1858(5):947–57.
121. GUIDELINES ON THE APPLICATION OF GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE TO THE CONTROL OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FOODS. *Codex Alimentarius*; 2007.
122. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001 Dec 4;71(1):1–20.
123. Mirdamadi S, Ghazvini SA, Taffreshi H. Production and nano-formulation of nisin in liposome as a slow release preservative against important food-born pathogens in UF cheese. *Abstr 14th Eur Congr Biotechnol Spain* 13–16 Sept 2009. 2009 Sep;25, Supplement(0):S193.
124. Al-Holy MA, Al-Nabulsi A, Osaili TM, Ayyash MM, Shaker RR. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control.* 2012 Jan;23(1):48–53.
125. Benech R-O, Kheadr EE, Lacroix C, Fliss I. Impact of Nisin Producing Culture and Liposome-encapsulated Nisin on Ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar Cheese. *J Dairy Sci.* 2003 Jun;86(6):1895–909.
126. Malheiros P da S, Sant'Anna V, Barbosa M de S, Brandelli A, Franco BDG de M. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int J Food Microbiol.* 2012 Jun 1;156(3):272–7.
127. Laridi R, Kheadr EE, Benech R-O, Vuilleumard JC, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *Int Dairy J.* 2003;13(4):325–36.
128. Jung DS, Bodyfelt FW, Daeschel MA. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J Dairy Sci.* 1992 Feb;75(2):387–93.

129. Martinez RCR, Alvarenga VO, Thomazini M, Fávoro-Trindade CS, Sant'Ana A de S. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT - Food Sci Technol*. 2016 May;68:67–75.
130. Nattress FM, Yost CK, Baker LP. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2001 Oct 22;70(1–2):111–9.
131. Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Sci*. 2008 Oct;80(2):159–66.
132. Cutter C N, Siragusa G R. Reductions of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. *Food Microbiol*. 1996;13(1):23–33.
133. Siragusa GR, Dickinson JS. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Beef Tissue by Application of Organic Acids Immobilized in a Calcium Alginate Gel. *J Food Sci*. 1992 Mar 1;57(2):293–6.
134. Barbosa WB, Sofos JN, Schmidt GR, Smith GC. Growth Potential of Individual Strains of *Listeria monocytogenes* in Fresh Vacuum-Packaged Refrigerated Ground Top Rounds of Beef. *J Food Prot*. 1995 Apr 1;58(4):398–403.
135. Grau FH, Vanderline PB. Growth of *Listeria monocytogenes* on Vacuum-packaged Beef. *J Food Prot*. 1990 Sep 1;53(9):739–41.
136. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. 2014 Jan;35(1):177–83.
137. Hui G, Liu W, Feng H, Li J, Gao Y. Effects of chitosan combined with nisin treatment on storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Chem*. 2016 Jul 15;203:276–82.
138. Govaris A, Solomakos N, Pexara A, Chatzopoulou PS. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int J Food Microbiol*. 2010 Feb 28;137(2–3):175–80.
139. Cosby DE, Harrison MA, Toledo RT, Craven SE. Vacuum or Modified Atmosphere Packaging and EDTA-Nisin Treatment to Increase Poultry Product Shelf Life. *J Appl Poult Res*. 1999 Jun 20;8(2):185–90.
140. Economou T, Pournis N, Ntzimani A, Savvaidis IN. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chem*. 2009 Jun 15;114(4):1470–6.
141. Jamuna M, Babusha ST, Jeevaratnam K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiol*. 2005;22(5):449–54.
142. Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Vannini L, Salvetti E, Torriani S, et al. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. *Food Microbiol*. 2016 Apr;54:11–9.
143. Rose NL, Sporns P, Dodd HM, Gasson MJ, Mellon FA, McMullen LM. Involvement of dehydroalanine and dehydrobutyrine in the addition of glutathione to nisin. *J Agric Food Chem*. 2003 May 7;51(10):3174–8.

144. Chung KT, Dickson JS, Crouse JD. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl Environ Microbiol.* 1989 Jun;55(6):1329–33.
145. Cutter CN, Siragusa GR. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. *Food Microbiol.* 1994 Dec;11(6):481–9.
146. Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 2008 Feb;25(1):120–7.
147. Vignolo G, Palacios J, Farias ME, Sesma F, Schillinger U, Holzapfel W, et al. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr Microbiol.* 2000 Dec;41(6):410–6.
148. Weiss J, Takhistov P, McClements DJ. Functional Materials in Food Nanotechnology. *J Food Sci.* 2006 Nov 1;71(9):R107–16.
149. Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydr Polym.* 2013 Jun 5;95(1):50–6.
150. Colas J-C, Shi W, Rao VSNM, Omri A, Mozafari MR, Singh H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Microsc Nanobiotechnology.* 2007 Dec;38(8):841–7.
151. da Silva Malheiros P, Daroit DJ, da Silveira NP, Brandelli A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiol.* 2010 Feb;27(1):175–8.
152. Boualem K, Subirade M, Desjardins Y, Saucier L. Development of an Encapsulation System for the Protection and Controlled Release of Antimicrobial Nisin at Meat Cooking Temperature. *J Food Res Vol 2 No 3 2013DO - 105539jfrv2n3p36.* 2013 Apr 24;
153. Prombutara P, Kulwatthanasal Y, Supaka N, Sramala I, Chareonpornwattana S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control.* 2012 Mar;24(1–2):184–90.
154. Chopra M, Kaur P, Bernela M, Thakur R. Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control* [Internet]. (0). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513004702>
155. Krivorotova T, Cirkovas A, Maciulyte S, Staneviciene R, Budriene S, Serviene E, et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocoll.* 2016 Mar;54, Part A:49–56.
156. Khaksar R, Hosseini SM, Hosseini H, Shojaee-Aliabadi S, Mohammadifar MA, Mortazavian AM, et al. Nisin-loaded alginate-high methoxy pectin microparticles: preparation and physicochemical characterisation. *Int J Food Sci Technol.* 2014;49(9):2076–82.
157. Hu Y, Wu T, Wu C, Fu S, Yuan C, Chen S. Formation and optimization of chitosan-nisin microcapsules and its characterization for antibacterial activity. *Food Control.* 2017 Feb;72, Part A:43–52.
158. Wu C, Wu T, Fang Z, Zheng J, Xu S, Chen S, et al. Formation, characterization and release kinetics of chitosan/[gamma]-PGA encapsulated nisin nanoparticles. *RSC Adv.* 2016;6(52):46686–95.

159. Salmaso S, Elvassore N, Bertuccio A, Lante A, Caliceti P. Nisin-loaded poly-l-lactide nano-particles produced by CO₂ anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. *Int J Pharm.* 2004 Dec 9;287(1–2):163–73.
160. Bi L, Yang L, Bhunia AK, Yao Y. Carbohydrate nanoparticle-mediated colloidal assembly for prolonged efficacy of bacteriocin against food pathogen. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Jul;108(7):1529–36.
161. Kopermsub P, Mayen V, Warin C. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Res Int.* 2011 Mar;44(2):605–12.
162. Heunis TDJ, Smith C, Dicks LMT. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat *Staphylococcus aureus*-induced skin infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):3928–35.
163. Ahire JJ, Dicks LMT. Nisin Incorporated With 2,3-Dihydroxybenzoic Acid in Nanofibers Inhibits Biofilm Formation by a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2015 Mar;7(1):52–9.
164. Fahim HA, Khairalla AS, El-Gendy AO. Nanotechnology: A Valuable Strategy to Improve Bacteriocin Formulations. *Front Microbiol.* 2016;7:1385.
165. Yokota D, Moraes M, Pinho SC. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Braz J Chem Eng.* 2012;29(2):325–35.
166. Alishahi A. Antibacterial Effect of Chitosan Nanoparticle Loaded with Nisin for the Prolonged Effect. *J Food Saf.* 2014 May 1;34(2):111–8.
167. Maresca D, De Prisco A, La Storia A, Cirillo T, Esposito F, Mauriello G. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT - Food Sci Technol.* 2016 Mar;66:436–43.
168. Hosseini SM, Hosseini H, Mohammadifar MA, German JB, Mortazavian AM, Mohammadi A, et al. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydr Polym.* 2014 Mar 15;103(0):573–80.
169. Chopra M, Kaur P, Bernela M, Thakur R. Surfactant assisted nisin loaded chitosan-carageenan nanocapsule synthesis for controlling food pathogens. *Food Control.* 2014 Mar 1;37(Supplement C):158–64.
170. Narsaiah K, Jha SN, Wilson RA, Mandge HM, Manikantan MR. Optimizing microencapsulation of nisin with sodium alginate and guar gum. *J Food Sci Technol.* 2014 Dec;51(12):4054–9.
171. Huq T, Riedl B, Bouchard J, Salmieri S, Lacroix M. Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Cellulose.* 2014;21(6):4309–21.
172. Guiga W, Swesi Y, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Sebti I. Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010 Apr;11(2):352–60.
173. Li B, Kennedy JF, Peng JL, Yie X, Xie BJ. Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr Polym.* 2006 Sep 13;65(4):488–94.
174. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Sci Technol.* 2005 Dec;38(8):859–65.

175. Sanjurjo K, Flores S, Gerschenson L, Jagus R. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Res Int.* 2006 Jul;39(6):749–54.
176. Sivarooban T, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res Int.* 2008 Oct;41(8):781–5.
177. Sebti I, Chollet E, Degraeve P, Noel C, Peyrol E. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *J Agric Food Chem.* 2007 Feb 7;55(3):693–9.
178. Chacko J, Lalpuria M, Floros J, Anantheswaran R. Controlled Release of Nisin from Biopolymer Films.
179. Imran M, Klouj A, Revol-Junelles A-M, Desobry S. Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, poly-lactic acid and chitosan for active packaging applications. *J Food Eng.* 2014 Dec;143:178–85.
180. Shiroodi SG, Nesaei S, Ovissipour M, Al-Qadiri HM, Rasco B, Sablani S. Biodegradable Polymeric Films Incorporated with Nisin: Characterization and Efficiency against *Listeria monocytogenes*. *Food Bioprocess Technol.* 2016;1–12.
181. Scannell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin®. *Int J Food Microbiol.* 2000;60(2–3):241–9.
182. Bhatia S, Bharti A. Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *J Food Sci Technol.* 2015 Jun;52(6):3504–12.
183. Imran M, El-Fahmy S, Revol-Junelles A-M, Desobry S. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydr Polym.* 2010 Jun 11;81(2):219–25.
184. Sebti I, Delves-Broughton J, Coma V. Physicochemical Properties and Bioactivity of Nisin-Containing Cross-Linked Hydroxypropylmethylcellulose Films. *J Agric Food Chem.* 2003 Oct 1;51(22):6468–74.
185. Colak Basak Yilin, Peynichou Pierre, Galland Sophie, Oulahal Nadia, Prochazka Frédéric, Degraeve Pascal. Antimicrobial Activity of Nisin and Natamycin Incorporated Sodium Caseinate Extrusion-Blown Films: A Comparative Study with Heat-Pressed/Solution Cast Films. *J Food Sci.* 2016 Apr 6;81(5):E1141–50.
186. Ku K, Song KB. Physical properties of nisin-incorporated gelatin and corn zein films and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Mar;17(3):520–3.
187. Cé N, Noreña CPZ, Brandelli A. Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. *CyTA - J Food.* 2012 Feb 1;10(1):21–6.
188. Ko S., Janes M.E., Hettiarachchy N.S., Johnson M.G. Physical and Chemical Properties of Edible Films Containing Nisin and Their Action Against *Listeria Monocytogenes*. *J Food Sci.* 2006 Jul 20;66(7):1006–11.
189. Guerra NP, Macias CL, Agrasar AT, Castro LP. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40(2):106–10.
190. Dawson PL, Carl GD, Acton JC, Han IY. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poult Sci.* 2002 May;81(5):721–6.

191. McCormick KE, Han IY, Acton JC, Sheldon BW, Dawson PL. In-package Pasteurization Combined with Biocide-impregnated Films to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in Turkey Bologna. *J Food Sci.* 2006 May 31;70(1):M52–7.
192. Theivendran S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. *J Food Sci.* 2006 Mar 1;71(2):M39–44.
193. Ye M, Neetoo H, Chen H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol.* 2008 Feb;25(2):260–8.
194. Ye M, Neetoo H, Chen H. Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Int J Food Microbiol.* 2008 Oct 31;127(3):235–40.
195. Siragusa GR, Cutter CN, Willett JL. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 1999 Jun;16(3):229–35.
196. Guiga W, Galland S, Peyrol E, Degraeve P, Carnet-Pantiez A, Sebti I. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009 Apr;10(2):203–7.
197. Xiao D, Michael Davidson P, D’Souza DH, Lin J, Zhong Q. Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation. *J Food Eng.* 2010 Sep;100(2):194–200.
198. Derrien M, Badr A, Gosselin A, Desjardins Y, Angers P. Optimization of a green process for the extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Sci Technol.* 2017 Jun 1;79:170–7.
199. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Tong HHY, Chow AHL. Particle size analysis in pharmaceuticals: principles, methods and applications. *Pharm Res.* 2007 Feb;24(2):203–27.
200. Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Elkin 06 Int Electrokinet Conf June 25-29 Nancy Fr.* 2007 May 15;309(2):194–224.
201. Rodriguez L. Estabilidad de los sistemas coloidales. In: *Sistemas coloidales en farmacia.*
202. Uskokovic V. Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. *J Dispers Sci Technol.* 2012 Dec 1;33(12):1762–86.
203. Lin P-C, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):711–26.
204. Smith DJ. Chapter 1 Characterization of Nanomaterials Using Transmission Electron Microscopy. In: *Nanocharacterisation (2)* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2015. p. 1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/9781782621867-00001>
205. Buckley K, Ryder AG. Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing: A Short Review. *Appl Spectrosc.* 2017;71(6):1085–116.
206. Guerrero P, Retegi A, Gabilondo N, de la Caba K. Mechanical and thermal properties of soy protein films processed by casting and compression. *J Food Eng.* 2010 Sep 1;100(1):145–51.

207. Stuchell YM, Krochta JM. Enzymatic Treatments and Thermal Effects on Edible Soy Protein Films. *J Food Sci.* 1994 Nov 1;59(6):1332–7.
208. Nonsee K, Supitchaya C, Thawien W. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *Int Food Res J.* 2011 Nov;18(4):1531.
209. Gill P, Moghadam TT, Ranjbar B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *J Biomol Tech JBT.* 2010 Dec;21(4):167–93.
210. Gregorova A. Application of Differential Scanning Calorimetry to the Characterization of Biopolymers. In: *Applications of Calorimetry in a Wide Context.* Sunderland University; 2013.
211. Padinjakkara A, Thankappan A, Gomes Souza Jr. F, Sabu T. *Biopolymers and Biomaterials.* 1st edition. Apple Academic Press; 2018.
212. Ahmed S, Kanchi S. *Handbook of Bionanocomposites.* Pan Stanford; 2018.
213. Kanatt SR, Rao MS, Chawla SP, Sharma A. Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll.* 2012 Dec;29(2):290–7.
214. Hu D, Wang H, Wang L. Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. *LWT - Food Sci Technol.* 2016 Jan 1;65:398–405.
215. Sun L, Sun J, Chen L, Niu P, Yang X, Guo Y. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. *Carbohydr Polym.* 2017 May 1;163:81–91.
216. Mohamed C, Clementine KA, Didier M, Gérard L, Marie Noëlle D-C. Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. *Food Hydrocoll.* 2013 Mar;30(2):576–80.
217. Zhang S, Zhao H. Preparation and properties of zein–rutin composite nanoparticle/corn starch films. *Carbohydr Polym.* 2017 Aug 1;169:385–92.
218. Arora S, Gupta S, Narang RK, Budhiraja RD. Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for h. Pylori. *Sci Pharm.* 2011 Sep;79(3):673–94.
219. Cafaggi S, Russo E, Stefani R, Leardi R, Caviglioli G, Parodi B, et al. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin–alginate complex. *Fourth Int Nanomedicine Drug Deliv Symp.* 2007 Aug 16;121(1–2):110–23.
220. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad FJ, Khar RK. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Mar;68(3):513–25.
221. Brandt AL, Castillo A, Harris KB, Keeton JT, Hardin MD, Taylor TM. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Food Antimicrobials Applied Singly and in Combination. *J Food Sci.* 2010 Nov 1;75(9):M557–63.
222. Branen JK, Davidson PM. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int J Food Microbiol.* 2004 Jan 1;90(1):63–74.
223. Braun JV, Braun JD. A Simplified Method of Preparing Solutions Of Glycerol and Water for Humidity Control—A Technical Note. *CORROSION.* 1958 Mar 1;14(3):17–8.

224. ASTM. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2002. Report No.: D882-02.
225. Park S, Zhao Y. Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *J Agric Food Chem*. 2004 Apr 1;52(7):1933–9.
226. ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. West Conshohocken, PA: ASTM International; 2000. Report No.: E96-00.
227. Noshirvani N, Ghanbarzadeh B, Mokarram RR, Hashemi M, Coma V. Preparation and characterization of active emulsified films based on chitosan-carboxymethyl cellulose containing zinc oxide nano particles. *Int J Biol Macromol*. 2017 Jun 1;99:530–8.
228. Andrade-Mahecha MM, Tapia-Blácido DR, Menegalli FC. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. *Carbohydr Polym*. 2012 Apr 2;88(2):449–58.
229. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016 Apr 1;6(2):71–9.
230. Arthur TM, Wheeler TL, Shackelford SD, Bosilevac JM, Nou X, Koohmaraie M. Effects of low-dose, low-penetration electron beam irradiation of chilled beef carcass surface cuts on *Escherichia coli* O157:H7 and meat quality. *J Food Prot*. 2005 Apr;68(4):666–72.
231. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. InfoStat [Internet]. Grupo InfoStat, FCA. 2011. Available from: <http://www.infostat.com.ar/>
232. Fernández-Urrusuno R, Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato J, José Alonso M. Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles. *Pharm Res*. 1999 Oct 1;16(10):1576–81.
233. Chandrasekar V, Coupland JN, Anantheswaran RC. Release Kinetics of Nisin from Chitosan–Alginate Complex Films. *J Food Sci*. 2016 Oct 1;81(10):E2503–10.
234. De S, Robinson D. Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-L-lysine–alginate nanospheres. *J Controlled Release*. 2003 Apr 14;89(1):101–12.
235. Sarmento B, Ribeiro AJ, Veiga F, Ferreira DC, Neufeld RJ. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007 Aug;7(8):2833–41.
236. Hsu B-L, Weng Y-M, Liao Y-H, Chen W. Structural investigation of edible zein films/coatings and directly determining their thickness by FT-Raman spectroscopy. *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 29;53(13):5089–95.
237. Dieing T, Hollricher O, Toporski J. Raman Micro-spectral Imaging of Cells and Intracellular Drug Delivery. In: *Confocal Raman Microscopy*. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 137–63.
238. Hernández R, Sacristán J, Mijangos C. Sol/Gel Transition of Aqueous Alginate Solutions Induced by Fe²⁺ Cations. *Macromol Chem Phys*. 2010 Jun 1;211(11):1254–60.
239. Campos-Vallette MM, Chandía NP, Clavijo E, Leal D, Matsuhira B, Osorio-Román IO, et al. Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc*. 2010 Jul 1;41(7):758–63.

240. Pawar DD, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Barbuddhe SB. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci.* 2000 Nov;56(3):215–9.
241. Smigic N, Miocinovic J, Tomic J, Tomasevic I, Rajkovic A, Djekic I. The effect of nisin and storage temperature on the quality parameters of processed cheese. Vol. 68. 2018. 182 p.
242. Holčápková P, Kolarova Raskova Z, Hrabalíkova M, Salakova A, Drbohlav J, Sedlarik V. Isolation and Thermal Stabilization of Bacteriocin Nisin Derived from Whey for Antimicrobial Modifications of Polymers. Vol. 2017. 2017. 1 p.
243. Khan I, Oh D-H. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2016 Apr 1;34:376–84.
244. Krivorotova T, Staneviciene R, Luksa J, Serviene E, Sereikaite J. Impact of pectin esterification on the antimicrobial activity of nisin-loaded pectin particles. *Biotechnol Prog.* 2017 Jan 1;33(1):245–51.
245. Gruskiene R, Krivorotova T, Sereikaite J. Nisin-loaded pectin and nisin-loaded pectin-inulin particles: Comparison of their proteolytic stability with free nisin. *LWT - Food Sci Technol.* 2017 Sep 1;82:283–6.
246. Grower JL, Cooksey K, Getty KJK. Development and characterization of an antimicrobial packaging film coating containing nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 2004 Mar;67(3):475–9.
247. Sobral PJA, Menegalli FC, Hubinger MD, Roques MA. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. 5th Int Hydrocoll Conf. 2001 Jul 11;15(4):423–32.
248. Shankar S, Wang L-F, Rhim J-W. Preparation and properties of carbohydrate-based composite films incorporated with CuO nanoparticles. *Carbohydr Polym.* 2017 Aug 1;169:264–71.
249. Wang H, Zhang R, Zhang H, Jiang S, Liu H, Sun M, et al. Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly(vinyl alcohol). *Carbohydr Polym.* 2015 Aug 20;127:64–71.
250. Wu C, Tian J, Li S, Wu T, Hu Y, Chen S, et al. Structural properties of films and rheology of film-forming solutions of chitosan gallate for food packaging. *Carbohydr Polym.* 2016 Aug 1;146:10–9.
251. Bastarrachea L, Dhawan S, Sablani SS, Mah J-H, Kang D-H, Zhang J, et al. Biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films incorporated with nisin: characterization and effectiveness against *Listeria innocua*. *J Food Sci.* 2010 May;75(4):E215–224.
252. Kittur FS, Harish Prashanth KV, Udaya Sankar K, Tharanathan RN. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydr Polym.* 2002 Aug 1;49(2):185–93.
253. Zimet P, Mombrú ÁW, Faccio R, Brugnini G, Miraballes I, Rufo C, et al. Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT.* 2018 May 1;91:107–16.
254. Henrique CM, Teófilo RF, Sabino L, Ferreira MMC, Cereda MP. Classification of Cassava Starch Films by Physicochemical Properties and Water Vapor Permeability Quantification by FTIR and PLS. *J Food Sci.* 2007 May 1;72(4):E184–9.
255. Peng Y, Wu Y, Li Y. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *Int J Biol Macromol.* 2013 Aug 1;59:282–9.

256. Zhu G-Q, Wang F-G, Liu Y-Y, Gao Q-C. Properties of water-soluble carboxymethyl chitosan film modified by hydrophobic poly(propylene glycol). *Chem Pap*. 2013 Apr 1;67(4):423–8.
257. Srinivasa PC, Ramesh MN, Kumar KR, Tharanathan RN. Properties and sorption studies of chitosan–polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydr Polym*. 2003 Sep 1;53(4):431–8.
258. Lim H, Hoag SW. Plasticizer Effects on Physical–Mechanical Properties of Solvent Cast Soluplus® Films. *AAPS PharmSciTech*. 2013 Sep;14(3):903–10.
259. Immergut EH, Mark HF. Principles of Plasticization. In: *Plasticization and Plasticizer Processes*. American Chemical Society; 1965. p. 1–26. (Advances in Chemistry; vol. 48).
260. Mohsin M, Hossin A, Haik Y. Thermomechanical properties of poly(vinyl alcohol) plasticized with varying ratios of sorbitol. *Mater Sci Eng A*. 2011 Jan 25;528(3):925–30.
261. Muller J, Jiménez A, González-Martínez C, Chiralt A. Influence of plasticizers on thermal properties and crystallization behaviour of poly(lactic acid) films obtained by compression moulding. *Polym Int*. 2016 Apr 19;65(8):970–8.
262. Vieira MGA, da Silva MA, dos Santos LO, Beppu MM. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur Polym J*. 2011 Mar 1;47(3):254–63.
263. López-Rodríguez N, Sarasua JR. Plasticization of Poly-L-lactide with L-lactide, D-lactide, and D,L-lactide monomers. *Polym Eng Sci*. 2013 Jan 16;53(10):2073–80.
264. Zhang Y, Han JH. Crystallization of high-amylose starch by the addition of plasticizers at low and intermediate concentrations. *J Food Sci*. 2010 Feb;75(1):N8-16.
265. Zehetmeyer G, Meira SMM, Scheibel JM, de Oliveira RVB, Brandelli A, Soares RMD. Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications. *J Appl Polym Sci*. 2015 Dec 11;133(13).
266. Jin T, Liu L, Zhang H, Hicks K. Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Sci Technol*. 2009 Feb 1;44(2):322–9.
267. Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A. Physicochemical properties of chitosan–essential oils filmforming dispersions. Effect of homogenization treatments. 11th Int Congr Eng Food ICEF11. 2011 Jan 1;1:44–9.
268. Rinaudo M, Milas M, Dung PL. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol*. 1993 Oct 1;15(5):281–5.
269. Chen L, Du Y, Wu H, Xiao L. Relationship between molecular structure and moisture-retention ability of carboxymethyl chitin and chitosan. *J Appl Polym Sci*. 2002 Feb 7;83(6):1233–41.
270. Kong X. Simultaneous determination of degree of deacetylation, degree of substitution and distribution fraction of –COONa in carboxymethyl chitosan by potentiometric titration. *Carbohydr Polym*. 2012 Mar 17;88(1):336–41.
271. Hirai A, Odani H, Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. *Polym Bull*. 1991 Jul 1;26(1):87–94.

Anexo 1: Caracterización de quitosano y carboximetil quitosano

1 Procedimiento experimental

1.1 Determinación del peso molecular de CS

Se determinó la masa molecular promedio viscosimétrica (M_v) mediante la determinación de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ de soluciones de CS en ácido acético 0.3 M/acetato de sodio 0.2 M a 25 °C. Los valores de tiempo de caída (t) se obtuvieron utilizando un viscosímetro de tipo Ubbelohde y se obtuvo el promedio de cinco medidas de tiempo. La viscosidad relativa (η_r) y la viscosidad específica (η_{sp}) se calcularon según:

$$\eta_r = t/t_0$$

$$\eta_{sp} = 1 - \eta_r$$

El valor de $[\eta]$ correspondió a la ordenada en el origen de la regresión lineal de la curva de η_{sp} en función de la concentración (c). Para calcular M_v se utilizó la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (268):

$$[\eta] = K (M_v)^a$$

Donde $K=0.0745$ ml/g y $a= 0.76$ (268).

1.2 Determinación del peso molecular de CMCS

El M_v de CMCS se determinó mediante la determinación de $[\eta]$ de soluciones de CMCS en NaCl 0.1 M a 30 °C. Los valores de (t) se obtuvieron utilizando un viscosímetro de tipo Ubbelohde y se obtuvo el promedio de cinco medidas de tiempo y M_v se calculó utilizando la ecuación de MHS, usando valores de $K= 7.92 \times 10^{-4}$ ml/g y $a= 1$ (269).

1.3 Grado de sustitución de CMCS

El grado de sustitución (DS) de CMCS se determinó por titulación potenciométrica. Para eso, se disolvió CMCS (0.21 g) en agua destilada (40 ml). La solución se ajustó a pH <2 con HCl. Luego, se tituló la solución de CMCS con NaOH acuoso 0.45 M y se registraron los valores de pH de la solución. La cantidad de NaOH acuoso se determinó mediante el método diferencial de segundo orden. El DS se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (57,270):

$$DS = 203 \times ([NaOH] \times (v_2 - v_1)) / m - (80 \times [NaOH] \times (v_2 - v_1))$$

Donde 203 es la masa molar promedio del residuo de quitina, la unidad repetitiva de CS; [NaOH] es la concentración de NaOH, v_1 es el volumen de base agregado para alcanzar el primer punto de inflexión; v_2 es el volumen de base agregado para alcanzar el segundo punto de inflexión; m es la masa de CMCS y 80 es la masa molar promedio del grupo $-CH_2COONa$.

1.4 Espectroscopía 1H NMR

Los análisis de CS y CMCS por 1H NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance Neo a 25 °C. Los biopolímeros (5 mg) se disolvieron en 1 ml de DCl/D₂O 1% (v/v). Las condiciones de medida fueron: ventana espectral de 400 MHz, 32k puntos de datos, ángulo de pulso de 30° y tiempo de adquisición de 3.99 s.

El grado de desacetilación (DD) de cada biopolímero se calculó según (79,271):

$$DD(\%) = \left(1 - \frac{\frac{I_{CH_3}}{3}}{\frac{I_{H_2-H_6}}{6}} \right) \times 100$$

donde I_{CH_3} es la integral de la señal de los hidrógenos de las unidades de GlcNAc (~ 2.0 ppm), $I_{H_2-H_6}$ es la integral correspondiente a los hidrógenos H₃–H₆ de las unidades GlcNy al hidrógeno unido al C2 de la unidad GlcNAc (~ 3.3–4.0 ppm).

2 Resultados

2.1 Determinación del peso molecular de CS

Como se observa en la **Figura A 1**, se obtuvo un valor de $[\eta]$ de 400.26 (ml/g) y el valor resultante de M_v para el CS analizado, calculado utilizando la ecuación de MHS, fue de 80.98 kDa.

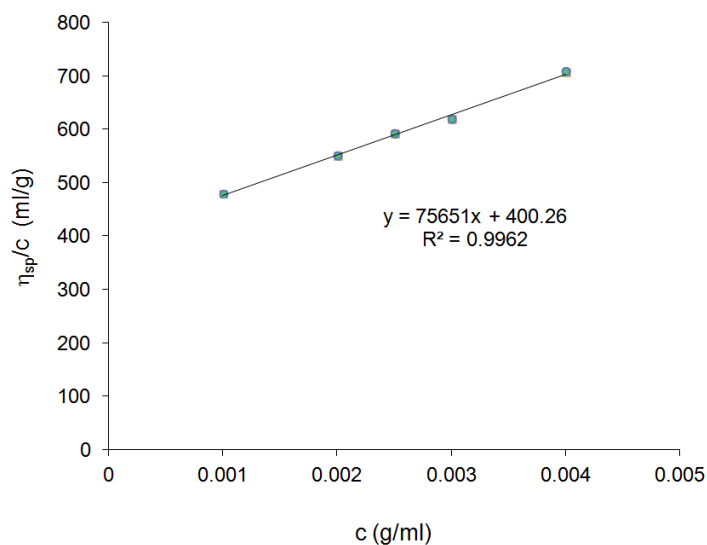


Figura A 1. Regresión lineal de η_{sp} versus concentración (c) para soluciones de CS en ácido acético 0.3 M/acetato de sodio 0.2 M a 25 °C.

2.2 Determinación del peso molecular de CMCS

Como se observa en la **Figura A 2**, se obtuvo un valor de $[\eta]$ de 233.99 (ml/g) y el valor resultante de M_v para el CS analizado, calculado utilizando la ecuación de MHS, fue de 295.44 kDa.

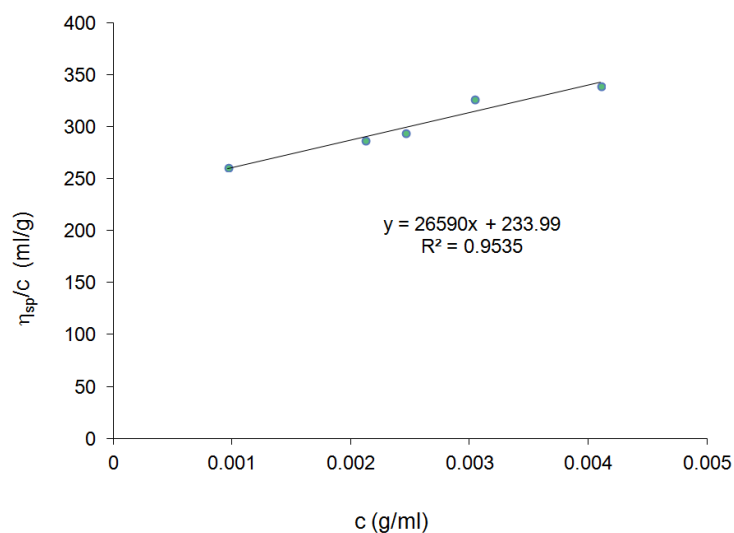


Figura A 2. Regresión lineal de η_{sp} versus concentración (c) para soluciones de CMCS en NaCl 0.1 M a 30 °C.

2.3 Determinación del DS de CMCS

A partir de la curva de titulación (**Figura A 3a**) y su derivada segunda (**Figura A 3b**) se determinaron los valores de v_1 and v_2 , los cuales resultaron 20.1 y 18.5 ml respectivamente. Por lo tanto, el valor de DS obtenido fue de 94.5% según los cálculos descritos en 1.3.

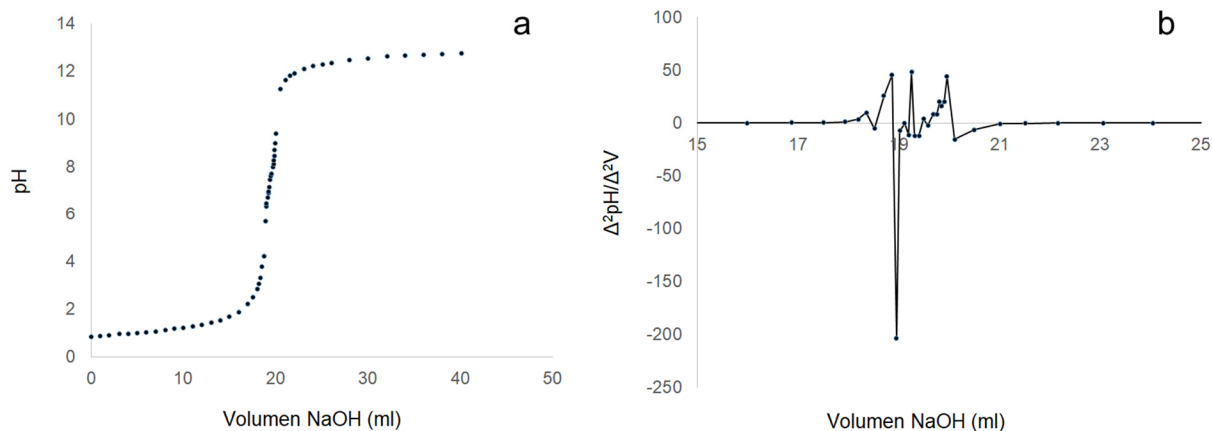


Figura A 3. (a) Curva de titulación potenciométrica de CMCS, (b) curva de derivada segunda.

2.4 Análisis por ^1H NMR

Se obtuvieron los espectros para las muestras de CS y CMCS en DCl/D₂O 1% (**Figura A 4** y **Figura A 5**) y los valores obtenidos de DD fueron de 81.9% para CS y 96.9% para CMCS.

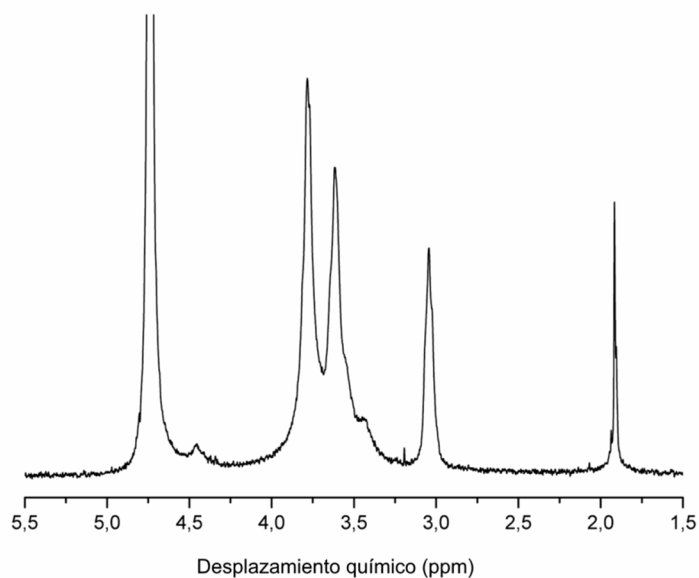


Figura A 4. Espectro ^1H NMR de CS en DCl/D₂O 1% (v/v).

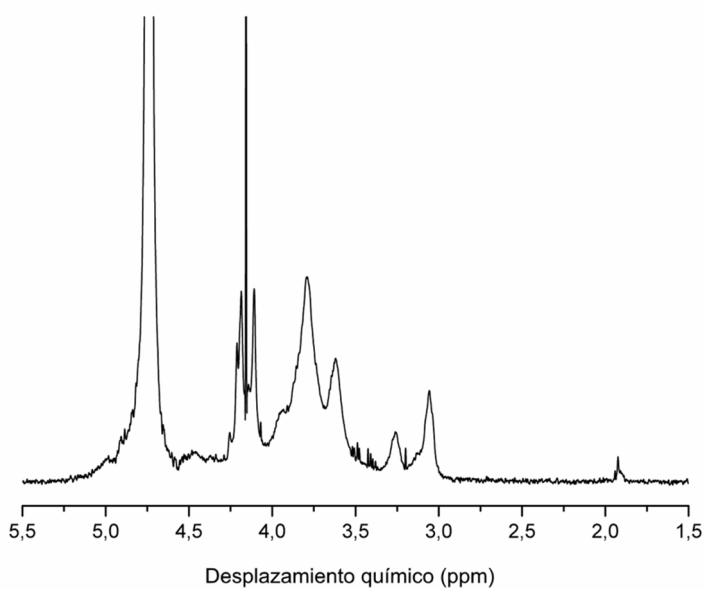


Figura A 5. Espectro ^1H NMR de CMCS en DCl/D₂O 1% (v/v).

Tal como se muestra en la **Figura A 5**, se observa que las señales se solapan en la región que se ubica entre 4.05 y 4.55 ppm, por lo que no se pudo distinguir la resonancia de los protones de hidrógeno unidos a C3 de aquellos hidrógenos unidos a C6. Estos resultados estuvieron en línea con aquellos reportados por Kong (270), por lo que las señales observadas en esta región fueron atribuidas a los protones de ambos grupos 3- y 6- carboximetilo sustituidos (-O-CH₂-COOD) de CMCS. Por otra parte, se encontraron señales entre 3.2 y 3.3 ppm, las cuales fueron atribuidos a los protones de los grupos N-CH₂-COOD, sugiriendo que fracciones de los grupos amino fueron afectados por la carboximetilación.

Las integrales de la región entre 4.05 y 4.55 ppm y 3.2 y 3.3 ppm fueron de 3.89 y 0.61 respectivamente, por lo que el CMCS analizado presentó un 86.4% de carboximetilación en la posición O (C3 y C6) y un 13.6% en la posición N (N2).

Anexo 2: Ensayos preliminares de películas de quitosano/carboximetil quitosano

1 Procedimiento experimental

Se prepararon distintas dispersiones de CS/CMCS variando el volumen de ambas soluciones de manera de alcanzar una concentración de biopolímero total de 1% (p/v). Las relaciones CS/CMCS ensayadas fueron 1/0, 4/1, 3/1, 1/1, 1/3 y 0/1 (p/p).

Para evaluar la miscibilidad de ambos biopolímeros, se determinó el rendimiento (R) del proceso. Para eso, las suspensiones con distintas relaciones CS/CMCS se centrifugaron a 4000 RPM por 10 min, se separó el sobrenadante (soluciones formadoras de películas) y se dejó secar el precipitado en estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante. El rendimiento (R) se calculó según:

$$R(\%) = \frac{|m_t - m_p|}{m_t} \times 100$$

Donde m_t (g) es la masa de biopolímero total (inicial) y m_p (g) es la masa de biopolímero insoluble (precipitado).

Asimismo, se tomaron medidas de pH de las dispersiones obtenidas.

2 Resultados

Se estudiaron formulaciones conteniendo distintas relaciones de CS y CMCS. Los valores de pH y de R(%) encontrados variaron considerablemente en función de la cantidad de biopolímeros utilizada, como se aprecia en la **Tabla A 1**. Todas las mezclas (4/1, 3/1, 1/1 y 1/3) presentaron turbidez y precipitación de biopolímeros en distintos grados siendo las dispersiones con mayor proporción de CS las que alcanzaron los porcentajes de R más elevados.

Por otra parte, los valores de pH obtenidos para las distintas dispersiones variaron entre 4.5 y 9.8. El CS es soluble en solución acética diluida, mientras que el CMCS es soluble a pH neutro. Es

decir que a medida que aumentó la proporción de CS, el pH resultante fue más ácido y los sólidos precipitados probablemente correspondieron a CMCS y a PECs de CS/CMCS insolubles a ese pH. De la misma manera, a medida que la proporción de CMCS en la mezcla aumentó, también aumentó el pH, precipitando mayoritariamente CS y PECs insolubles. Por lo tanto, la formación de soluciones turbias, pero sin precipitación indicaría la formación de PECs de CS/CMCS solubles.

En todos los casos las películas obtenidas fueron transparentes y flexibles. Sin embargo, a medida que aumentó la fracción de CMCS, las películas se tornaron levemente más quebradizas.

A partir de estos resultados preliminares, se estableció una zona de trabajo (de mayor miscibilidad entre los biopolímeros) que comprendió desde relaciones CS/CMCS 4/1 hasta 1/0 (p/p). Esto se basó tanto en la evaluación cualitativa de las películas y en el hecho de que el R fue mayor en esta zona.

Tabla A 1. Valores de pH y R (%) para distintas relaciones CS/CMCS.

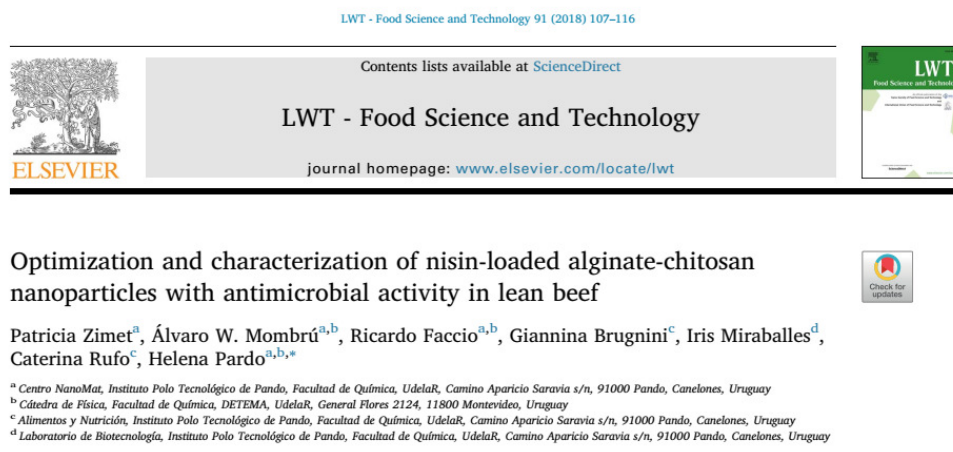
CS (%)	CMCS (%)	CS/CMCS (p/p)	R (%)	pH
100	0	1/0	100 ± 0	4.49 ± 0.02
80	20	4/1	85.6 ± 2.3	4.69 ± 0.01
75	25	3/1	84.9 ± 4.2	4.73 ± 0.05
50	50	1/1	54.9 ± 0.9	5.27 ± 0.01
25	75	1/3	45.0 ± 6.1	7.27 ± 0.05
0	100	0/1	100 ± 0	9.81 ± 0.07

Anexo 3: Publicaciones y ponencias

- (a) Artículo publicado en Carbohydrate Polymers (Elsevier): “Physico-chemical and antilisterial properties of nisin-incorporated chitosan/carboxymethyl chitosan films”.



- (b) Artículo publicado en LWT- Food Science and Technology (Elsevier): “Optimization and characterization of nisin-loaded alginate/chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef”.



- (c) Presentación de póster: “Optimización y caracterización de nanopartículas de alginato-chitosano conteniendo nisina con actividad listericida en carne vacuna magra”. Patricia

Zimet; Álvaro W. Mombrú; Ricardo Faccio; Giannina Brugnini; Iris Miraballes; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Juan Pablo Villanueva; Caterina Rufo; Helena Pardo, Quinto Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI), octubre de 2017.

- (d) Presentación de póster: "Preparación y evaluación de película bionanocompuesta a base de quitosano y nanopartículas de nisina". Patricia Zimet; Álvaro W. Mombrú; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Juan Pablo Villanueva; Caterina Rufo; Helena Pardo, Quinto Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENAQUI), octubre de 2017.
- (e) Presentación oral: "SISTEMA DE NANOENCAPSULACIÓN DE NISINA CON ACTIVIDAD LISTERICIDA EN CARNE VACUNA". Patricia Zimet; Álvaro W. Mombrú; Ricardo Faccio; Giannina Brugnini; Iris Miraballes; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Juan Pablo Villanueva; Caterina Rufo; Helena Pardo, Simposio INNOVA, setiembre de 2017.
- (f) Presentación de póster: "SISTEMA DE NANOENCAPSULACIÓN DE NISINA CON ACTIVIDAD LISTERICIDA EN CARNE VACUNA". Patricia Zimet; Álvaro W. Mombrú; Ricardo Faccio; Giannina Brugnini; Iris Miraballes; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Juan Pablo Villanueva; Caterina Rufo; Helena Pardo, Simposio INNOVA, setiembre de 2017.
- (g) Presentación de póster: "INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE NISINA A PELÍCULA COMESTIBLE BIODEGRADABLE DE POTENCIAL APLICACIÓN EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS". Patricia Zimet; Álvaro W. Mombrú; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Juan Pablo Villanueva; Caterina Rufo; Helena Pardo, Simposio INNOVA, setiembre de 2017.
- (h) Presentación de póster: "Síntesis de nanopartículas de alginato y quitosano con actividad antibacteriana". Patricia Zimet; Analía Castro; Pablo Miranda; Luciana Pereira; Iris Miraballes; Químicas (ENAQUI), noviembre de 2015.