



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 712**

51 Int. Cl.:
A23L 1/056 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05725795 .8**

96 Fecha de presentación : **17.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1732399**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Películas de lisozima-quitosano.**

30 Prioridad: **18.03.2004 US 554623 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73 Titular/es: **The State of Oregon Acting by and Through the State Board of Higher Education on Behalf of Oregon State University Office of Technology Transfer 312 Kerr Administrative Building Corvallis, Oregon 97331-2140, US**

72 Inventor/es: **Zhao, Yanyun; Park, Su-Il y Daeschel, Mark, A.**

74 Agente: **García Egea, Isidro José**

ES 2 359 712 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Películas de lisozima – quitosano .

5 La presente invención divulga películas antimicrobianas que son especialmente útiles para la protección de productos alimenticios.

ANTECEDENTES

10 En productos alimenticios sólidos o semisólidos, el crecimiento microbiano tiene lugar principalmente en la superficie. El tratamiento con calor y los conservantes químicos han sido los métodos más comúnmente usados para mantener la sanidad microbiológica y la calidad alimenticia. Las películas de empaquetado con refuerzo antimicrobiano tienen una gran capacidad para asegurar la sanidad microbiológica de las superficies alimenticias por medio de la liberación controlada de sustancias antimicrobianas desde una estructura de película portadora hasta la superficie alimenticia. Adicionalmente, la preocupación del consumidor acerca de los conservantes alimenticios químicos sintéticos ha dado lugar a un interés incrementado en películas protectoras comestibles alternativas, más "amigas del consumidor".

20 La lisozima es una enzima lítica, bien estudiada, que se encuentra en muchos sistemas naturales. Es una enzima pequeña y estable con una estructura y secuencia bien estudiadas. El uso de la lisozima en la conservación de alimentos es viable debido a su estabilidad sobre un amplio intervalo de condiciones de pH y de temperatura. Sin embargo, su eficacia antimicrobiana restringida frente a bacterias Gram – negativas ha limitado su aplicación en la industria alimenticia. El quitosano es un conocido bio – polímero formador de película que también muestra actividad antimicrobiana.

25 La patente estadounidense 6.451.365 divulga una composición antibacteriana que comprende: (a) un primer componente que incluye al menos un compuesto bacterio – estático o bactericida gram positivo seleccionado del grupo consistente de bacteriocinas lantibióticas, pediocina, y de la clase lactinas, y enzimas líticas; y (b) un segundo componente que incluye al menos un compuesto seleccionado del grupo consistente de ácidos de lúpulo y derivados de ácidos de lúpulo.

La patente japonesa JP 08089224 divulga un conservante que comprende una saponina esteroide, con una sustancia antimicrobiana específica, extraída de Yuca.

35 La patente japonesa JP 11032742 divulga una solución acuosa de quitosano que comprende al menos una clase de surfactante no – iónico aniónico.

La patente japonesa JP 10015042 divulga un compuesto que consiste esencialmente de sal de calcio soluble en agua y quitosano.

40 Chen et al., en *Journal of Food Processing and Preservation* 20 (1996) 379-390, divulgan una película antimicrobiana que comprende metilcelulosa mezclada con quitosano y benzoato de sodio o sorbato de potasio.

45 Continúa existiendo una necesidad de películas con una actividad antimicrobiana reforzada sin que sus propiedades mecánicas se vean significativamente reducidas.

RESUMEN

50 Un aspecto de esta divulgación contempla una película de compuesto que comprende lisozima incorporada dentro de una matriz de polímero de quitosano. En otro aspecto, se divulga una película que incluye quitosano, y de alrededor de 10 a alrededor de 200 de peso porcentual de lisozima, basada en el peso del quitosano.

55 También se divulga un método para la fabricación de una película que incluye la disolución o dispersión de quitosano y lisozima en un medio acuoso resultando en una solución o dispersión formadora de película; la aplicación de la solución o dispersión formadora de película a una superficie de sustrato; y conversión de la solución o dispersión formadora de película en una película.

En una aplicación particularmente útil, la película es un protector antimicrobiano para un producto alimenticio.

60 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es un gráfico que representa el modelo de liberación de lisozima desde una matriz de película de compuesto de lisozima-quitosano hasta 0.15 M de un amortiguador de fosfato como una función temporal. N=6; L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20 = 20 % de lisozima (con/sin quitosano); L60 = 60 % de lisozima (con/sin quitosano); L100 = 100 % de lisozima (con/sin quitosano). El grosor de película fue de $72.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$.

Las Figuras 2A y 2B son gráficos que representan los efectos de las películas de compuesto de lisozima-quitosano frente al *E. coli* en cultivo BHI (2A) y *S. faecalis* en cultivo MRS (2B). N=6; control = sin película; L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20 = 20 % de lisozima (con/sin quitosano); L60 = 60 % de lisozima (con/sin quitosano); L100 = 100 % de lisozima (con/sin quitosano).

Las Figuras 3A-3D son micrográficos electrónicos escaneados de la superficie de películas de compuesto de lisozima-quitosano vistos en una ampliación de 1.000X; L0 (3A), L20 (3B), L60 (3C), L100 (3D). L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20 = 20 % de lisozima (con/sin quitosano); L60 = 60 % de lisozima (con/sin quitosano); L100 = 100 % de lisozima (con/sin quitosano).

Las Figuras 4A – 4D son micrográficos electrónicos escaneados de las secciones transversales de películas de compuesto de lisozima-quitosano vistos en una ampliación de 1.000X; L0 (4A), L20 (4B), L60 (4C), L100 (4D). L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20 = 20 % de lisozima (con/sin quitosano); L60 = 60 % de lisozima (con/sin quitosano); L100 = 100 % de lisozima (con/sin quitosano).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para una comprensión más fácil, se describen *infra* de forma más detallada los términos empleados en esta memoria:

“Condiciones de temperatura ambiente” significa una temperatura ambiente de entre alrededor de 10° C a alrededor de 40° C, generalmente de entre alrededor de 20° C a alrededor de 25° C, una presión de aproximadamente una atmósfera, y una atmósfera que contiene una cierta cantidad de humedad.

Un “análogo” es una molécula que difiere en su estructura química de un compuesto matriz, por ejemplo un homólogo (diferenciado por un incremento en la estructura química, tal como una diferencia en la longitud de una cadena alifática), un fragmento molecular, una estructura que difiere en uno o más grupos funcionales, o un cambio en la ionización.

Una “cantidad efectiva antimicrobiana” es una cantidad de un componente antimicrobiano o mezcla de componentes que es suficiente para inhibir el crecimiento de al menos un microbio en una muestra a un grado estadísticamente significativo, preferiblemente por al menos alrededor del 25 %, más preferiblemente por al menos alrededor del 50 %, y más preferiblemente inhibiendo completamente el crecimiento del microbio, comparado con una muestra de control que carezca del componente antimicrobiano.

“Quitosano” (también denominado poli-(1→4)-β-D-glucosamina) es inclusivo de la quitina deacetilada (la quitina es también denominada como β-(1-4)-poli-N-acetil-D-glucosamina) y sales de la misma como se describe más en detalle *infra*. Las conchas de los mariscos y crustáceos son una fuente habitual de quitina, de la cual se deriva el quitosano.

“Película” es inclusivo de recubrimientos, y la película puede ser discontinua o sustancialmente continua sobre la superficie del producto alimenticio al que se aplica o sobre el que se forma. Por ejemplo, “película” incluye tanto una película sin compartimentos con la que se puede envolver un producto alimenticio, y un recubrimiento formado sobre el producto alimenticio por medio de rociado, baño, goteo o una técnica similar.

“Inhibición” significa que las películas divulgadas aquí ralentizarán o detendrán el crecimiento o proliferación de ciertos microbios durante un cierto período de tiempo.

“Lisozima” denota una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de ciertos mucopolisacáridos de paredes celulares bacterianas, concretamente los vínculos glicosídicos β (1-4) entre ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, y que causan lisis bacteriana. Las lisozimas que pueden ser usadas aquí incluyen lisozimas que se dan de forma natural, lisozimas sintéticas, y lisozimas recombinantes como se describe en detalle *infra*.

“Microbio” o “microbiano” se usarán aquí para referirnos a organismos o materia microscópica, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos, capaces de infectar a humanos o animales y/o causar deterioro en los alimentos u otra degradación o alteración en la comida no deseable. El término “anti – microbiano” será así usado aquí para referirnos a un material o agente que mata o, de otra manera, inhibe el crecimiento de organismos fúngicos y/o bacterianos.

Las descripciones de términos *supra* se proporcionan únicamente para ayudar al lector, y no deberían ser interpretados de tal forma que tengan un alcance inferior al entendido por un experto habitual en la materia o como limitativos del alcance de las reivindicaciones que se acompañan.

Los términos singulares “uno/a”, y “el, la” incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. De forma similar, el término “o” incluye “y”, salvo que el contexto indique claramente otra

cosa. La palabra “comprende” indica “incluye”. A menos que se indique otra cosa, la descripción de los componentes en la nomenclatura química hace referencia a los componentes en el momento de la adición a cualquier combinación especificada en la descripción, pero no necesariamente excluye las interacciones químicas entre los componentes de una mezcla una vez mezclados.

Las películas divulgadas aquí incluyen al menos un quitosano y al menos una lisozima, siendo ambos materiales abundantemente disponibles y renovables. Se ha descubierto que una matriz de película basada en el quitosano puede, efectivamente, portar una alta concentración de lisozima resultando en películas de compuesto de lisozima-quitosano. La lisozima puede ser liberada de la matriz de película de quitosano polimérico de forma controlada y retiene su actividad lítica frente a sustratos de pared celular bacteriana. Por ejemplo, el componente antimicrobiano lisozima (y quitosano, en ciertos casos) puede ser liberado de la película y migrar al interior de la estructura del producto alimenticio. Tales películas de compuesto tienen una actividad antimicrobiana sinérgica, reforzada frente tanto a las bacterias Gram – positivas como frente a las Gram – negativas, en contraste con el quitosano, por sí solo, o la lisozima, por sí sola, sin disminuir las características de detención de la humedad de las películas. En ciertos ejemplos de la película, todos los componentes son comestibles para el consumo seguro de humanos o animales, y están disponibles de fuentes renovables. Adicionalmente, la película es biodegradable.

La lisozima está distribuida de forma sustancialmente homogénea por toda la red polimérica formada por las moléculas de quitosano. La lisozima puede existir en forma de micro – partículas distribuidas en el interior de la red de quitosano mientras que las moléculas de lisozima tienen enlaces de hidrógeno y/o van der Waals interactuando con las moléculas de quitosano.

El quitosano es un polímero abundante, renovable y no tóxico que es biocompatible con muchas otras sustancias. Cualquier forma o grado (por ejemplo, médico o alimenticio) de quitosano, puede ser utilizado para fabricar la película. Por ejemplo, el peso molecular medio de viscosidad del quitosano puede estar en el intervalo de entre alrededor de 20 a alrededor de 2.000 kDa, y el grado de deacetilación puede estar en el intervalo de alrededor del 70 % a alrededor del 90 %. De acuerdo con un ilustrativo método para fabricar la película, el ingrediente quitosano (o mezclas de diferentes quitosanos) se disuelve inicialmente en una solución de ácido acuoso resultando en la formación de una sal de quitosano. Los ejemplos de la sal de quitosano resultante que está presente en la película incluyen acetato de quitosano, sorbato de quitosano, propionato de quitosano, lactato de quitosano, glutamato de quitosano, benzoato de quitosano, citrato de quitosano, maleato de quitosano, glicolato de quitosano, acrilato de quitosano, succinato de quitosano, oxalato de quitosano, ascorbato de quitosano, tartarato de quitosano, y mezclas de los mismos. La cantidad de quitosano en la película puede variar dependiendo de las propiedades de la película deseada. Por ejemplo, la película puede contener de alrededor de 25 a alrededor de 90, más específicamente de alrededor de 35 a alrededor de 65, en porcentaje de peso de quitosano, basado en el peso sólido total de la película.

Las lisozimas son polipéptidos antimicrobianos naturales que se producen en diversos organismos incluyendo virus, pájaros, mamíferos y plantas. En humanos, las lisozimas se encuentran en el bazo, pulmón, riñón, leucocitos, plasma, saliva, leche, lágrimas y cartilago. Así, la lisozima puede ser aislada de la leche, fluido lagrimal, saliva y mucosidad nasal de los humanos. Se encuentra en la leche y en el calostro de las vacas. Ha sido también posible aislar la lisozima del zumo de la coliflor. Sin embargo, la fuente más importante que permite la extracción a escala industrial de la lisozima es la albúmina del pollo. La lisozima es conocida también como muramidasa o hidrolasa N-acetilmuramilo. La forma humana puede ser también producida de forma recombinante. En las películas divulgadas aquí, las cantidades efectivas de lisozima pueden variar dependiendo de la fuente de la lisozima. Algunas son más potentes que otras, siendo la lisozima del pollo menos activa que la lisozima humana. La cantidad efectivamente antimicrobiana de lisozima en la película puede también variar dependiendo de las propiedades de la película deseada. En especial, una cantidad mínima de lisozima debería ser suficiente para proporcionar actividad antimicrobiana. La cantidad máxima de lisozima no debería ser lo suficientemente grande como para degradar de forma significativa las propiedades mecánicas de la película o de permeabilidad al vapor de agua. Por ejemplo, la lisozima puede estar presente en la película en una cantidad de alrededor de 10 a alrededor de 200 en porcentaje de peso, más específicamente entre alrededor del 10 a alrededor de 100 en porcentaje de peso, y más especialmente entre alrededor de 30 a alrededor de 90 en porcentaje de peso, por peso de quitosano. En otras palabras, la película puede incluir una cantidad de lisozima de hasta dos veces la cantidad de quitosano. Si la cantidad de lisozima excede el 200 por cien por peso del quitosano, la película puede hacer muy frágil y, mecánicamente, débil.

Un ingrediente opcional de la película es, al menos, un plastificador, que puede o no ser un material renovable. El plastificador puede reducir la fragilidad de la película, e incrementar la flexibilidad de la película y su resistencia al impacto. Plastificadores ilustrativos incluyen al glicerol, sorbitol, glicol de propileno, glicol de etileno, glicol de dietileno, glicol de trietileno, glicol de polietileno (por ejemplo, PEG 300 y PEG 400), tartrato de dibutilo, propanediol, butanediol, monoglicérido acetilado, y mezclas de los mismos. La cantidad de plastificador debería ser incrementada con una concentración cada vez mayor de lisozima debido a la débil naturaleza formadora de película de la lisozima. Por ejemplo, la película puede contener de alrededor de 1 a alrededor de 50, más específicamente de alrededor de 20 a alrededor de 30, en porcentaje de peso de plastificador por peso del quitosano.

Otro ingrediente opcional de la película es, al menos, un agente de reticulación, que puede ser o no un material renovable. El agente de reticulación puede mejorar la propiedad de barrera de vapor de agua que caracteriza a la película, y disminuir la solubilidad del agua de la película. Agentes de reticulación ilustrativos incluyen el glutaraldehído, formaldehído, glioxal, almidón de dialdehído, sustancias que contienen iones multivalentes (por ejemplo, cationes de calcio y magnesio) y mezclas de los mismos. La cantidad del agente de reticulación en la película puede variar dependiendo de las propiedades de la película deseada. Por ejemplo, la película puede contener de alrededor de 1 a alrededor de 20, más en concreto de alrededor de 5 a alrededor de 10, del agente de reticulación, medido en porcentaje de peso, basado en el peso del quitosano.

Ingredientes opcionales ulteriores incluyen antioxidantes, otros agentes antimicrobianos, agentes aromáticos/colorantes, agentes hidrofóbicos, nutricionales y aditivos similares. Para mejorar las propiedades de barrera de agua, pueden incorporarse a la composición de la película aditivos hidrofóbicos, como ácidos grasos (esto es, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico), glicéridos acetilados, ceras (esto es, cera carnauba, cera de abeja, y cera de parafina), y aceites (esto es, aceite mineral y aceite vegetal), en intervalos de concentración de alrededor de 20 a alrededor del 100 % por peso del quitosano. Pueden ser incorporados, a la matriz de la película, nutricionales, tales como minerales y vitaminas, para reforzar los valores nutricionales de productos envueltos o revestidos. Por ejemplo, pueden ser incorporados calcio, zinc y vitamina E para fortalecer el beneficio para la salud de productos envueltos o revestidos (ver Park, S.I., y Zhao, Y., 2004, *Incorporation of High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films*, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, vol. 52, pp. 1933-1939).

La película puede ser fabricada por cualquier técnica de formación incluyendo el vaciado (esto es, formación de película sin compartimentos), baño, pincelado, evaporación de película, y similares. De acuerdo con una variante, todos los ingredientes de la película se mezclan conjuntamente en una mezcla líquida (esto es, la mezcla de formación de película) que adopta entonces la forma de película. Por ejemplo, la mezcla líquida puede ser distribuida de forma sustancialmente uniforme sobre la superficie de un sustrato y, subsiguientemente, secada para formar la película. En un ejemplo específico, los ingredientes de la película son solubles en el agua o dispersables o son modificados para ser solubles en agua o dispersables (esto es, solubilizados). Los ingredientes se mezclan conjuntamente en una solución acuosa (esto es, el agua es portador o medio solvente) que es entonces secado al aire bajo temperatura y humedad ambiente para formar la película. Alternativamente, los ingredientes de la película podrían ser solubles en un portador solvente orgánico. Los ingredientes de la película pueden ser mezclados conjuntamente en cualquier orden.

La mezcla formadora de película debería ser relativamente fácil de fabricar y usar. La viscosidad de la mezcla formadora de película debería ser lo suficientemente baja como para permitir la aplicación y esparcimiento de la mezcla sobre un sustrato sin la necesidad de ninguna técnica de aplicación o equipamiento reforzados. Por ejemplo, la viscosidad de la mezcla formadora de película puede estar en el intervalo de entre alrededor de 10 cps a alrededor de 200 cps.

El quitosano es soluble en ácidos orgánicos acuosos o minerales. Ácidos orgánicos acuosos adecuados incluyen el ácido acético, el ácido sórbico, el ácido propiónico, el ácido láctico, el ácido glutámico, el ácido benzoico, el ácido cítrico, el ácido maleico, el ácido glicólico, el ácido acrílico, el ácido succínico, el ácido oxálico, el ácido ascórbico, el ácido tartárico, y mezclas de los mismos. Generalmente, el ácido orgánico está muy diluido, tal como, por ejemplo, una concentración de alrededor de 0.5 a alrededor de 5, más especialmente de alrededor de 1 a alrededor de 2, en porcentaje de peso dependiente del tipo de ácido en concreto.

En general, una cantidad predeterminada de quitosano se disuelve bajo temperatura ambiente en un ácido orgánico acuoso para producir una solución de sal de quitosano. El pH de la mezcla puede ser de alrededor de 2.5 a alrededor de 6.3, más especialmente de alrededor de 5.0 a alrededor de 6.0. La cantidad de quitosano disuelta en el ácido acuoso puede estar en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 5, más especialmente alrededor de 2, en porcentaje de peso, basado en el peso del agua y dependiendo de la cantidad deseada de quitosano en el la película obtenida como producto final. La solución de sal de quitosano puede incluir también cualquier de los ingredientes opcionales descritos *supra*, tal como un plastificador.

La lisozima puede ser añadida entonces a la solución de sal de quitosano. La lisozima puede ser añadida en forma de solución pura, en grado industrial, alimenticio o farmacéutico, disponible de diversos suministradores en el mercado. Alternativamente, una solución de lisozima para almacenamiento puede ser preparada por disolución de una cantidad predeterminada de lisozima en agua destilada. La cantidad de lisozima disuelta en el agua puede estar en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 20, más en concreto entre alrededor de 10 a alrededor de 15, en porcentaje de peso basado en el peso del agua y dependiendo de la concentración deseada de lisozima en la película obtenida como producto final. Si la cantidad de lisozima es demasiado grande, la solución formadora de película puede diluirse en un grado inaceptable, lo que podría afectar de forma adversa a las propiedades de la película. La solución de lisozima para almacenamiento puede incluir también alguno de los ingredientes opcionales descritos *supra*, tal como un plastificador.

La solución de sal de quitosano y la solución de lisozima para almacenamiento se mezclan conjuntamente bajo temperatura ambiente resultando en una solución formadora de película. Alternativamente, la solución formadora de película puede ser calentada a o hasta una temperatura de hasta alrededor de 50° C para fortalecer la disolución. La cantidad de la solución de sal de quitosano en relación con la cantidad de la solución de lisozima para almacenamiento se selecciona para obtener la cantidad deseada de lisozima. El pH de la solución acuosa formadora de película resultante puede ser ajustada para estar en el intervalo de alrededor de 5 a alrededor de 6 para proteger la comida al proporcionar unas condiciones de baja acidez.

La película podría ser aplicada a un producto alimenticio por cualquier método. La película se forma a partir de la solución formadora de película por la aplicación de la solución formadora de película a un sustrato. Por ejemplo, la solución formadora de película podría ser rociada o pincelada sobre la superficie para formar un recubrimiento protector, o el producto alimenticio puede ser bañado en la solución formadora de película. Alternativamente, un vaciado de película podría ser aplicado a la superficie del producto alimenticio por vía de envoltorio o por métodos similares. El sustrato recubierto de la solución puede ser calentado a una temperatura de alrededor de 25° C hasta alrededor de 65° C durante de alrededor de 2 horas a alrededor de 48 horas para formar la película. En la variante que implica el recubrimiento directo de un producto alimenticio, el tiempo de secado será, generalmente, más corto (por ejemplo, de alrededor de 5 a alrededor de 60 minutos con aire forzado).

La duración de la actividad antimicrobiana de la película depende de las condiciones medioambientales. En condiciones de alta humedad, el índice de migración de los componentes de recubrimiento hacia el interior del producto alimenticio se incrementará, disminuyendo así la duración efectiva de la actividad antimicrobiana. En ciertos ejemplos, las películas pueden permanecer intactas (esto es, la película retiene su color, dimensión y fuerza mecánica) durante hasta alrededor de cuatro meses a temperatura ambiente. En otros ejemplos, la actividad antimicrobiana podría permanecer hasta alrededor de tres semanas.

La cantidad de recubrimiento aplicado a un producto alimenticio debería ser suficiente para formar una película sobre la superficie sustancialmente continua. La cantidad varía dependiendo de una variedad de factores incluyendo el tipo de producto alimenticio, el método de aplicación y las propiedades deseadas pero podría estar en el intervalo de alrededor de 2 a alrededor de 30, más específicamente de alrededor de 5 a alrededor de 10 mg/cm² del área de la superficie del sustrato. De acuerdo con ciertos ejemplos, la película sin compartimentos debería tener un grosor de al menos alrededor de 20 µm, más específicamente de alrededor de 30 a alrededor de 80 µm. Un grosor de menos de 20 µm es ilustrativo de recubrimientos formados directamente sobre la superficie de la comida (por ejemplo, por baño).

El diseño de las películas divulgadas aquí está dirigido en particular hacia la inhibición de bacterias patógenas y de deterioro y de hongos sobre la superficie de la comida. Bacterias ilustrativas incluyen *Lactobacillus pantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., y *Pseudomonas* spp. Hongos ilustrativos incluyen el *Aspergillus niger*, *Monolinia fructicola*, *Botrytis cinerea* y *Rhizopus* spp.

Los productos alimenticios que pueden ser protegidos según los descritos aquí son generalmente aquellos que pueden ser vulnerables a deterioro en la calidad causado por crecimiento microbiano, deshidratación (pérdida de agua), y/o maduración debida a la respiración. Generalmente el queso (en bloque o en rodajas), y productos cárnicos procesados (jamón, perro caliente, salchicha, etc.) pueden ser envueltos usando películas desarrolladas o revestidos usando la solución formadora de película. Productos vegetales y fruta percedera, tales como fresas, cerezas, uvas, manzanas, peras, nectarinas, ciruelas y albaricoques, pueden ser revestidos para reforzar la seguridad microbiana y extender el tiempo de durabilidad antes de la venta del producto.

La película muestra unas características deseables de permeabilidad al vapor de agua. Por ejemplo, la permeabilidad al vapor de agua de la película puede estar en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 300, más específicamente de alrededor de 10 a alrededor de 100 g mm/m² d kPa. La permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas de la película pueden depender de la humedad relativa (HR) durante la formación de la película, en cuanto el agua puede actuar como un plastificador en películas de quitosano. En bajas condiciones de HR (por ejemplo, bajo el 40 %), las películas son materiales de barrera de gas relativamente buenos con características mejoradas de barrera de agua. En un 50 % de HR, las películas pueden demostrar propiedades mecánicas moderadas (por ejemplo, de 10 a 100 MPa en resistencia a la tensión y de 10 al 50 % en estiramiento hasta la ruptura) comparables a la película de polietileno de baja densidad (PEBD) disponible en el mercado. Las propiedades de barrera de agua de las películas pueden ser mejoradas por la adición de materiales lipídicos.

EJEMPLOS

Los ejemplos concretos descritos *infra* lo son a efectos ilustrativos y no deberían considerarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones que se adjuntan.

Ejemplo 1Materiales

5 El quitosano de camarón de Vanson Inc. (Redmond, WA) fue usado sin ulterior purificación. El quitosano de camarón estaba caracterizado por 11 cps de una viscosidad de un 1 % con/sin solución de ácido acético acuoso a 25° C y un 89.9 % de deacetilación. Se obtuvo lisozima blanca de huevo de gallina de Eiproducte GmbH und Co. (Alemania). Se obtuvo el glicerol de grado USP (*United States Pharmacopeia*, Farmacopea de Estados Unidos) de EM Science (Darmstadt, Alemania). Se obtuvo ácido acético glacial de grado reagente de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ).

10 Un *Streptococcus faecalis* ATCC 14508 Gram-positivo y un *Escherichia. Coli* Gram-negativo tipo B fueron utilizados como organismos de análisis. Un *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado obtenido de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) fue usado para la medición del modelo de liberación de lisozima. El caldo de infusión de calor cerebral (ICC), el caldo-MRS y el agar fueron comprados de Difco de Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD).

Preparación de soluciones formadoras de película

20 Las soluciones formadoras de película (SFP) fueron preparadas por la mezcla de una solución de quitosano con una solución de lisozima. La solución de quitosano fue preparada por la disolución de 2 % de peso quitosano en un 1 % de peso de solución de ácido acético con adición de 25 % de glicerol (con/sin lisozima). La solución de lisozima fue mezclada entonces en la solución de quitosano en una concentración de 0, 20, 60 ó 100 % (porcentaje de peso seco de lisozima por peso seco de quitosano). Las mezclas resultantes fueron homogenizadas a 3.000 revoluciones por minuto durante 60 segundos en un dispositivo Modelo PT 10-35 (Kinematica AG, Suiza). El pH de las SFPs fue ajustado a 5.2 con 5 N de hidróxido de sodio. Todas las soluciones de muestra fueron filtradas a través de una malla de nylon para eliminar los residuos insolubles y desgasificadas al vacío (Modelo 0211-P204, Gast Mfg. Corp., Benton Harbor, MI).

Formación de película

30 Una cantidad calculada de cada SFP desgasificada fue vaciada sobre una plancha de vidrio revestido de Teflón nivelado con una zona de 260 x 260 mm. para conseguir una grosor uniforme de película de alrededor de 70 µm. Después de secar a temperatura ambiente (24 ± 2° C y 40 ± 5 % humedad relativa) durante dos días, las películas secas fueron despegadas de las planchas y cortadas a trozos para su análisis. Fueron usados segmentos de la película con medidas de 25 x 25 mm. para evaluación del contenido en densidad y humedad. Los segmentos de la película que medían 25 x 86 mm. fueron usados para análisis mecánico. Los segmentos de película que medían 70 x 70 mm. fueron usados para análisis de la permeabilidad del vapor de agua. Previamente a todas las mediciones, los trozos de película fueron acondicionados en una cámara medioambiental (Modelo T10RS, Tenney Environmental, Williamsport, PA), puestos a 25° C y 50 % de humedad relativa durante al menos dos días.

Medición de grosor, densidad y contenido de humedad de película

40 Después de un acondicionamiento a 25° C y 50 % durante 2 días, el grosor de las películas fue medido en cinco ubicaciones al azar para cada ejemplar de película usando un micrómetro calibrador Modelo No. 293-766-30 (Mytutoyo Manufacturing Co. Ltd., Japan). La densidad de película fue calculada por la división del peso de la película por volumen de película. El contenido en humedad de las películas fue determinado de forma gravimétrica por secado de ejemplares de película a 105° C durante 18 horas en un horno de aire comprimido (Precision Scientific Inc., Chicago, IL). El porcentaje de contenido en humedad fue calculado en una base mojada.

Ensayo de liberación de lisozima

50 Fueron sumergidas muestras de alrededor de 0.03 gramos del ejemplar de película de lisozima-quitosano en 20 ml. de 0.15 M de amortiguador de fosfato (pH 6.2) en frasquitos y agitadas a 50 revoluciones por minuto usando un agitador (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick, NJ) a temperatura ambiente. Fue preparada una solución de sustrato almacenado de *M. lysodeikticus* en 0.15 de solución de amortiguador de fosfato (absorbencia de 0.65 a 450 nm). Fueron tomadas muestras de 1 µl de la mezcla a intervalos de tiempo de 0, 0.25, 1, 4, 12, 24, y 48 horas. Estas muestras fueron mezcladas con 2.5 ml de sustrato de *M. lysodeikticus* en una cubeta y, entonces, inmediatamente consultados durante 40 segundos a 25° C usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis 2100 (Shimadzu Co., Japón). Los índices de actividad de la lisozima fueron determinados por medición de la disminución en absorbencia de la solución a 450 nm, lo que refleja la hidrólisis del sustrato de pared celular. La disminución de la densidad óptica fue expresada como un cambio en unidades por minuto de absorbencia – Mille (M abs/min). Las unidades de actividad fueron convertidas a mg/l de lisozima basada en líneas de regresión con concentraciones normalizadas de lisozima en 0.15 M de amortiguador de fosfato y entonces a gramos de lisozima liberada por gramo de película seca.

Actividad antimicrobiana

Fueron cultivados *E. coli* y *S. faecalis* a 37° C durante la noche en caldo de infusión de calor cerebral (ICC) y caldo MRS, respectivamente. Un ml de muestras de estos microorganismos fue diluido con 99 ml de los mismos caldos para obtener aproximadamente 10⁷ CFU/ml de inóculos. Alrededor de 0.03 grs. de cada ejemplar de película fue ubicado en un disco petri (85 mm de diámetro), en el que fueron vertidos 10 ml de inóculos. El inóculo sin exposición a la película fue usado como un control. Los discos de petri fueron agitados a 50 revoluciones por minuto a temperatura ambiente. Fueron tomadas muestras a 0, 6, 12 y 24 horas, diluidas con frasquitos de dilución (DiluLock II® Butterfield's Buffer, Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA), y planchados por duplicado. Para el plancheo, fue usado agar ICC y MRS para *E. coli* y *S. faecalis*, respectivamente. Cada plancha fue incubada a 37° C durante 48 horas antes de contar el número de colonias.

Medición de la permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) fue determinada usando un método de taza a 25° C y 100/50 % RH pendiente, seguido de ASTM E 96 (ASTM 2000a). Se colocó once ml de agua destilada en cada taza de análisis fabricada de Plexiglas® con un diámetro interior de 57 mm. y una profundidad interna de 15 mm. La distancia entre el agua y la película fue de 10.7 mm y la zona efectiva de película fue 25.5 cm². Los ensamblajes de taza de análisis fueron ubicados en la cámara de temperatura y humedad controladas (25° C y 50 % RH). Cada ensamblaje de taza fue pesado cada hora durante 6 horas usando la balanza electrónica (exactitud a 0.0001 gramos) para registrar la pérdida de humedad en el tiempo. La PVA fue entonces corregida para la resistencia del hueco de aire estancado entre la película y la superficie del agua utilizando el método de corrección de PVA (Gennadios y otros, 1994).

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de la película fueron determinadas usando un analizador de textura (TA.XT2i, Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). Todas las mediciones de propiedad fueron llevadas a cabo inmediatamente después de eliminar los ejemplares de película de la cámara para minimizar las variaciones de humedad. El método ASTM D882 (ASTM 2000b) fue usado para medir la fuerza tensora (FT) y el porcentaje de alargamiento hasta la ruptura (AR). Cada ejemplar de película fue instalado entre los agarraderos (TA 96) del analizador de textura y analizado con una separación inicial de agarraderos de 50 mm. y una velocidad de cruceta de 1 mm/s. Se informó de valores TS de una carga máxima medida (N) dividida por una zona en sección transversal de película (mm²) con una unidad de MPa. Se obtuvieron valores AR por alargamiento hasta la ruptura registrado dividido por la longitud inicial del ejemplar y multiplicado por 100.

Microestructura

La superficie y la estructura interna de las películas fueron evaluadas usando un Microscopio de Escaneo por Electrones (AmRay 3300 FE de emisión de campo SEM, AmRay, Bedford, MA). Las partes de película fueron instaladas sobre cabos de aluminio y revestidas con aleación de oro y paladio usando un revestidor de renqueo (Modelo Edwards S 150B de revestidor de renqueo; BOC Edwards Vacuum, Ltd., UK). Cada muestra revestida fue examinada usando un voltaje de 5 kV con el haz de electrones dirigido normalmente hacia las muestras.

Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos tres veces. En cada repetición, fueron usados dos ejemplares de película para la liberación de lisozima y mediciones de actividad antimicrobiana; cinco muestras de película fueron usadas para densidad, contenido en humedad, y mediciones WVP; y fueron usadas 10 muestras de película para mediciones de propiedades mecánicas. El procedimiento de modelos lineales generales (MLG) fue aplicado al analizar las diferencias entre las diferentes películas usando el SAS (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC). Se llevó a cabo el procedimiento MLG para el análisis de variación (ANOVA) para todos los tratamientos. Se llevó a cabo el procedimiento REG para encontrar modelos de regresión adecuados para respuestas medidas. Se usó el test de intervalo múltiple de Duncan para las múltiples comparaciones de promedios. La significación de la diferencia fue definida a p<0.05.

Resultados – Formación de Película y Propiedades Físicas Básicas

Cuando se integra la lisozima en soluciones de quitosano, no se observó ninguna precipitación en ninguna de las SFPs. Esto demostró que las soluciones de quitosano disuelto en ácido acético tienen una buena compatibilidad con la lisozima soluble en el agua. Todas las películas secas fueron fáciles de despegar de las planchas de vaciado. El grosor de todos los tipos de películas fue cuidadosamente controlado en un intervalo de 72 ± 11 µm por vaciado de una cantidad calculada de SFPs. Esto aseguró que no se observaran diferencias estadísticas en el grosor de la película (p<0.05).

La Tabla 1 *infra* muestra la densidad y el contenido en humedad de cada película analizada (n=15). La película de quitosano puro (L0) tuvo los valores más elevados tanto en cuanto a densidad como en cuanto a

contenido de humedad. La densidad no fue estadísticamente diferente entre todas las películas. El contenido en humedad tendía a decrecer cada vez que aumentaba la concentración de lisozima. Aunque no está sujeto a ninguna teoría, esto podría suceder por tanto el quitosano como la lisozima contienen un número grande de grupos –OH y –NH₂. El enlace de hidrógeno es la principal fuerza de atracción entre estos grupos. La adición de moléculas de lisozima en cadenas de quitosano podría alterar la configuración estructural de las moléculas de quitosano al incrementar las interacciones entre las moléculas de quitosano y lisozima, tal como el enlace hidrógeno y las interacciones van der Waals. La lisozima contiene amino ácidos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Durante la formación de la película, un núcleo hidrofóbico de lisozima puede formarse con cadenas laterales de amino ácidos hidrofílicos sobresaliendo en la SFP acuosa por las mismas interacciones hidrofóbicas que juegan un importante papel en el pliegue de la lisozima (Proctor y Cunningham 1988). Estas cadenas laterales hidrofóbicas en la matriz de la película pueden afectar al contenido en humedad de las películas de compuesto de lisozima – quitosano.

Tabla 1: Composición y propiedades físicas de películas de compuesto de Lisozima-Quitosano

{ Composición }				
Tipo de película ¹	Lisozima (%, con/sin quitosano)	Glicerol (%, con/sin) ²	Densidad (g/ml)	Contenido de Humedad (%)
L0	0%	25	1.34±0.09	23.6±2.4
L20	20%	25	1.30±0.05	21.7±3.0
L60	60%	25	1.30±0.04	19.0±3.5
L100	100%	25	1.31±0.06	18.8±2.8

¹ Grosor de la Película = $72.6 \pm 8.2 \mu\text{m}$ L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20= 20% de lisozima (con/sin quitosano); L60= 60% de lisozima (con/sin quitosano); L100= 100% de lisozima (con/sin quitosano).

² Porcentaje en peso de glicerol basado en la suma del peso del quitosano y del peso de la lisozima en la SFP

Resultados – Liberación de lisozima

La cantidad de lisozima liberada a partir de la matriz de la película se muestra en la Figura 1. Las películas de quitosano sin lisozima (L0) no mostraron ninguna actividad lítica frente a *M. lysodeikticus* liofilizado, mientras que estas actividades se incrementaron proporcionalmente con una concentración incrementada de lisozima incorporada en la matriz de la película. Cuando las películas de compuesto de lisozima – quitosano fueron ubicadas en la solución amortiguadora de fosfato, las películas fueron hinchadas como resultado de la difusión de moléculas de agua en la estructura polimérica de la película, llevando a la liberación de lisozima incorporada al ambiente acuoso a partir de la matriz de la película. La lisozima fue liberada de forma logarítmica de la matriz de la película a lo largo del tiempo. La liberación de lisozima de la matriz de la película fue correlativa, de forma lineal, con la concentración inicial de lisozima de la matriz polimérica. El porcentaje de cantidad liberada de lisozima de cada ejemplar de película, después de 48 horas, fue de aproximadamente 65%, 79% y 76% para películas L20, L60 y L100, respectivamente. El porcentaje de cantidad liberada de lisozima de cada ejemplar de película, después de 24 horas, fue de aproximadamente 48%, 75% y 71% para películas L20, L60 y L100, respectivamente. El porcentaje de cantidad liberada de lisozima de cada ejemplar de película, después de 12 horas, fue de aproximadamente 43%, 60% y 56% para películas L20, L60 y L100, respectivamente. El porcentaje de cantidad liberada de lisozima de cada ejemplar de película, después de 1 hora, fue de aproximadamente 14%, 26% y 25% para películas L20, L60 y L100, respectivamente.

En alimentos semi – húmedos, el crecimiento microbiano se da principalmente en la superficie del alimento. En consecuencia, la conservación de los niveles deseados de antimicrobianos sobre la superficie alimenticia con difusión controlada y retrasada podría ser beneficiosa para alargar el tiempo de durabilidad antes de la venta de los alimentos. Estos resultados demuestran que la lisozima incorporada a las películas de quitosano puede ser liberada de la matriz de la película de forma controlada con una actividad lítica retenida frente al sustrato de pared celular bacteriana. Por ejemplo, después de alrededor de 24 horas hasta alrededor del 30% de la lisozima no ha sido aún liberada de la película. Después de alrededor de 48 horas hasta alrededor del 20% de la lisozima no ha sido aún liberada de la película.

Resultados – Actividad Antimicrobiana

Las Figuras 2A y 2B muestran la supervivencia de *E. coli* y *S. faecalis* en cultivo tratado con películas de lisozima-quitosano. La eficacia antimicrobiana de películas de compuesto de lisozima-quitosano frente a *E. coli* se incrementó con concentraciones incrementadas de lisozima, excepto con las películas L100. Después de 24 horas de incubación, los números de células fueron reducidos a alrededor de 1.8, 2.3, y 2.7 ciclos logarítmicos en cultivo ICC con películas L0, L20 ó L60, respectivamente. Al mismo tiempo, los números de células se incrementaron a alrededor de 0.1 y 2.3 ciclos logarítmicos con la película L100 y el control, respectivamente. Las películas L100 inhibieron el crecimiento hasta 6 horas seguido por recuperación de la población celular.

El crecimiento de *S. faecalis* no fue inhibido de forma efectiva por las películas de compuesto de lisozima-quitosano que contenían una baja concentración de lisozima (películas L0 y L20). Con las películas L0 y L20, la población de *S. faecalis* se incrementó ligeramente durante 24 horas de exposición. En contraste, se observaron reducciones logarítmicas 3.3 y 3.8 de *S. faecalis* en los cultivos que contienen películas L60 y L100, respectivamente. Tuvo lugar un incremento de alrededor de 1.1. de ciclo logarítmico en las muestras de control después de 24 horas. El incremento en la actividad antimicrobiana contra el *S. faecalis* Gram-positivo con concentración de lisozima incrementada puede indicar que la lisozima es la responsable primera de este efecto.

Las actividades antimicrobianas del quitosano contra el *E. coli* han sido revisadas por Shahidi (1999). Películas de quitosano puro L0 mostraron acción bactericida contra *E. coli* Gram-negativo, pero poco efecto inhibitorio en el crecimiento de *S. faecalis* Gram-positivo. La tendencia más estable de inhibición contra ambas bacterias se observó en películas L60. La recuperación de la población de *E. coli* con las películas L100 crea interrogantes, y puede ser explicada por interacciones incrementadas lisozima-quitosano. Las moléculas de quitosano liberadas de la matriz de la película pueden apilarse sobre las superficies de las células o interactuar con la lisozima para formar complejos de lisozima-quitosano. Cuando se expone una cantidad excesiva de lisozima a la suspensión celular, la probabilidad de interacciones de lisozima-quitosano puede incrementarse. Un incremento en estas interacciones puede interferir con la reacción entre quitosano y las superficies celulares.

La actividad antimicrobiana más fuerte contra *S. faecalis* se dio en películas de quitosano que contenían la concentración de lisozima más elevada (L100), mientras que para *E. coli* lo fue en las películas con un 60 % de concentración de lisozima (con/sin quitosano). Estos resultados indican que la actividad antimicrobiana del quitosano puede ser reforzada por incorporación de lisozima en la matriz de la película de quitosano. Adicionalmente, la relación moléculas de lisozima / moléculas de quitosano es un factor importante que afecta al comportamiento antimicrobiano de las películas de compuesto lisozima-quitosano.

Resultados – Permeabilidad al Vapor de Agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas no fue significativamente afectada por la incorporación de lisozima a los niveles de concentración analizados ($p < 0.05$) (ver Tabla 2 *infra*). Aun no estando sujeto a ninguna teoría, este resultado podría ser explicado por el efecto de dos factores opuestos. Las películas de quitosano, como muchas otras películas comestibles de proteínas o polisacáridos, exhiben unas características de barrera de agua relativamente bajas debido a su naturaleza hidrofílica. La propiedad de barrera de agua de la película de quitosano puede ser mejorada por la adición de materiales hidrofóbicos, tales como ácidos grasos. En cuanto la lisozima contiene cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos, la hidrofiliidad de películas de compuesto de lisozima-quitosano puede reducirse con la adición de lisozima. Sin embargo, la estructura compacta del quitosano, especialmente sus partes cristalinas, puede ser rota por la molécula de lisozima, resultando así en una PVA incrementada a través de la matriz de la película. Estos dos factores opuestos pueden compensar o minimizar la variación en las características de PVA de las películas de compuesto de lisozima-quitosano con concentraciones variables de lisozima.

Tabla 2: Permeabilidad al Vapor de Agua de Películas de Compuesto de Lisozima-Quitosano

Tipo de película ¹	Grosor (µm)	PVA (gmm/m ² d kpa)
L0	72.5±13.4	177.2±47.4
L20	68.8±6.6	157.4±26.5
L60	70.9±4.4	160.0±23.9
L100	69.0±9.8	166.2±22.2

¹ L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20= 20% de lisozima (con/sin quitosano); L60= 60% de lisozima (con/sin quitosano); L100= 100% de lisozima (con/sin quitosano).

Resultados – Permeabilidad al Vapor de Agua

La fuerza tensora (FT) y el porcentaje de alargamiento hasta la ruptura (AR) de las películas decreció significativamente ($p > 0.05$) con la adición de lisozima (ver Tabla 3 *infra*). Tanto la reducción de FT como de AR con concentración de lisozima incrementada pueden ser descritas por las siguientes ecuaciones lineares:

$$FT = -0.10C_1 + 16.70, R^2 = 0.96$$

$$AR = -0.32C_1 + 59.89, R^2 = 0.99$$

Donde C₁ es la concentración porcentual de lisozima en la matriz de película de lisozima-quitosano (% con/sin quitosano). En adición, se encontró que existe una relación lineal entre AR y FT:

$$AR=3.07TS + 8.30, R^2 = 0.98$$

En una proporción de quitosano y lisozima de 1:1 (L100), hubo reducciones de 43% y 48% en los valores de FT y AR, respectivamente. Sin embargo, tales reducciones no son lo suficientemente significativas para impedir el uso de las películas como un protector alimenticio.

El quitosano es un excelente polímero lineal de formación de películas con una estructura rígida hasta las últimas consecuencias, mientras que la lisozima es una enzima de carga positiva como menos capacidad de formación de película. Las reducciones tanto en FT como en AR indican que la incorporación de lisozima debilitó la estructura e integridad de la película. La introducción de moléculas de lisozima en la matriz de la película de quitosano interrumpe posiblemente la formación de estructura cristalina y debilita el enlace de hidrógeno intermolecular entre las moléculas de quitosano. El incremento de interacciones entre las moléculas de quitosano y lisozima en la matriz de la película pueden ser responsables de los cambios en el FT y en el AR de películas de compuesto de quitosano. Los valores disminuidos de FT y AR pueden atribuirse también a la degradación de las moléculas de quitosano por la lisozima, que es una enzima quitinólita. La degradación de moléculas de quitosano por lisozima puede ser reducida por el uso de quitosano altamente deacetilado (por ejemplo, un grado de deacetilación de al menos 95%). Adicionalmente, las propiedades mecánicas y propiedades de barrera de agua de las películas de compuesto de lisozima-quitosano pueden ser mejoradas por el uso de agentes de reticulación en la matriz de la película, tales como el glutaraldehído.

Tabla 3: Propiedades Mecánicas de Películas de Compuesto de Lisozima-Quitosano

Tipo de película ¹	Grosor (µm)	Fuerza Tensil (MPa)	Alargamiento (%)
L0	74.9+15.5	17.4+4.6	60.3+16.2
L20	70.8+9.2	14.4+3.4	53.8+9.0
L60	73.0+8.9	9.5+2.3	39.3+11.7
L100	69.9+9.2	7.4+1.5	29.1+8.2

¹ L0 = 0 % de lisozima (con/sin quitosano); L20= 20% de lisozima (con/sin quitosano); L60= 60% de lisozima (con/sin quitosano); L100= 100% de lisozima (con/sin quitosano).

Resultados – Microestructura

Las microfotografías SEM confirmaron unas excelentes biocompatibilidades entre el quitosano y lisozima y una distribución homogénea de lisozima por toda la matriz del quitosano. Las Figuras 3A-3D muestran la superficie exterior de las películas de compuesto de lisozima-quitosano expuestas al aire durante la formación de la película a una ampliación de 1000X. Como se muestra en las microfotografías SEM, las estructuras de superficie de las películas eran compactas y uniformes. Todas las películas tenían una apariencia homogénea indicando estructuras continuas sin poros ni grietas en la matriz. Las microfotografías de las películas L60 (3C) y L100 (3D) muestran un jaspeado brillante sobre la superficie de la película. Este jaspeado estaba distribuido de forma uniforme y se incrementaba al incrementarse las concentraciones de lisozima. Las zonas blancas podrían representar la sedimentación de micropartículas de lisozima en la matriz de quitosano.

Las Figuras 4A-4D muestran las microfotografías de secciones transversales en películas de compuesto de lisozima-quitosano. Se obtuvieron bordes afilados mediante la congelación de las películas con nitrógeno líquido y su posterior ruptura. Como se muestra en las Figuras 4A-4D, no había grietas verticales o separaciones de fases entre el quitosano y la lisozima. Las estructuras en sección transversal eran compactas y continuas excepto algunas fracturas paralelas a las superficies, que pueden haber sido formadas cuando las películas fueron rotas. La distribución uniforme de lisozima por toda la matriz de la película está indicada por la apariencia homogénea de las películas con altas concentraciones de lisozima (4C y 4D). La micrografía de la película L20 (4B) muestra material extraño que puede haber caído en la película durante el secado. Este tipo de contaminación podría ser una desventaja de los métodos de formación de película de evaporación de solvente, especialmente si las películas son fundidas y secadas en un ambiente de aire abierto.

Ejemplo hipotético 2

Una SFP alternativa podría ser preparada por la disolución de 2 % de peso de quitosano en 1 % de peso de solución ácida con la adición de 50 % de peso de ácido láurico, 25 % de peso de glicerol y 100 % de peso de lisozima (con/sin quitosano) a 65° C. La película sería preparada entonces como se describió en el Ejemplo 1. La

adición de un ácido graso (esto es, ácido láurico) a la solución formadora de película puede mejorar las propiedades de barrera de agua de la película sin afectar significativamente su actividad antimicrobiana.

Ejemplo 3

Las soluciones de revestimiento fueron preparadas por la mezcla de una solución de quitosano con una solución de lisozima. La solución de quitosano fue preparada por disolución de un 3 % de quitosano en una solución de un 1 % de ácido acético con adición de un 25 % de glicerol (con/sin quitosano). La solución de lisozima fue preparada por disolución de un 10 % de lisozima en agua destilada con adición de 25 % de glicerol (con/sin lisozima). La solución de lisozima fue mezclada en la solución de quitosano en una concentración del 60 % (porcentaje de peso seco de lisozima por peso seco de quitosano). La mezcla resultante fue homogeneizada usando un homogeneizador (PT 10-35, Kinematica, Suiza), a 3.000 revoluciones por minuto durante 60 segundos. Fueron usados *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *Lactobacillus plantarum* como microorganismos de análisis para evaluar la eficacia antimicrobiana de los tratamientos de revestimiento sobre superficies alimenticias. Fueron cultivados *L. monocytogenes* y *L. plantarum* a 37° C durante la noche en caldo de infusión de calor cerebral (ICC) y caldo MRS, respectivamente.

Se adquirieron salchichas de Frankfurt de ternera procesadas comercialmente (Bun-Lenght, Oscar Mayer Foods Corp., Madison, Wisconsin) que se cortaron en longitudes de 26 mm. (de unos 10 grs.) en condiciones asépticas. Fueron bañadas salchichas de Frankfurt de ternera en rodajas en la solución de revestimiento durante 30 segundos y secadas durante 30 minutos en una plancha de flujo de aire laminar vertical (100-plus, Enviro Corp., Albuquerque, Nuevo México). Unas muestras de control no revestidas y otras muestras revestidas fueron inoculadas con 100 µl de *L. monocytogenes* o *L. plantarum* (aprox. 2×10^3 CFU/ml), ubicadas en una bolsa de plástico al vacío de 200 mm. x 150 mm. (FoodSaver Vac 1075, Tilia, Inc., San Francisco, CA).

Después de cuatro días de almacenaje a $22.5 \pm 1^\circ$ C, cada muestra de salchicha de Frankfurt de ternera fue situada en una bolsa Stomacher estéril. La bolsa de plástico al vacío fue enjuagada con 90 ml. de 0.1 % de agua de peptona y trasladada a la misma bolsa Stomacher. Las muestras fueron maceradas con pulverizador tipo Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward, Londres, Reino Unido) a 230 revoluciones por minuto durante 2 minutos. Las suspensiones fueron enumeradas para poblaciones microbianas en duplicado. Fueron usados agar ICC y agar MRS para *L. monocytogenes* y *L. plantarum*, respectivamente. Fueron incubadas a 37° C durante 48 horas planchas de Petri de plástico que contenían medios microbianos antes de contar el número de colonias microbianas.

Los efectos de los tratamientos de revestimiento en el crecimiento de *L. monocytogenes* o *L. plantarum* inoculados sobre la superficie de salchichas de Frankfurt de ternera revestidas y no revestidas se muestran en la Tabla 4. Los tratamientos de revestimiento de compuesto de lisozima – quitosano resultaron en una inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* sobre la superficie de la salchicha de Frankfurt de ternera. Sin embargo, se observaron ligeros incrementos en los números de células de *L. plantarum* bajo las mismas condiciones.

Tabla 4: Efecto de revestimientos sobre el crecimiento microbiano de salchichas de Frankfurt de ternera inoculadas con *L. monocytogenes* o *L. plantarum*.

Microorganismo	Tratamiento	CFU Logarítmico/ gramo de salchicha Frankfurt ternera	
		0 días	4 días
<i>L. monocytogenes</i>	No – revestido	2.39	3.74
	Revestido	2.39	0
<i>L. plantarum</i>	No – revestido	3.15	4.27
	Revestido	3.15	4.74

Ejemplo 4

Un queso Cheddar mediano fabricado para el mercado (Tillamook County Creamery Association, Tillamook, Oregón) fue usado como sistema alimenticio alternativo para la demostración de las propiedades antimicrobianas de la aplicación del revestimiento de compuesto de lisozima-quitosano. Las lonchas de queso fueron cortadas, de forma aséptica, con unas dimensiones de 60 mm. x 26 mm. x 5 mm. (de unos 10 grs.) y revestidas con la solución de revestimiento descrita en el Ejemplo 3. Todos los procedimientos fueron idénticos al del Ejemplo 3. Como se muestra en la Tabla 5, fue inhibido tanto el crecimiento de *L. monocytogenes* como el de *L. plantarum*

Tabla 5: Efecto de revestimientos sobre el crecimiento microbiano de queso cheddar en lonchas inoculado con *L. monocytogenes* o *L. plantarum*.

5	Microorganismo	Tratamiento	CFU Logarítmico/ gramo de queso	
			0 días	4 días
	<i>L. monocytogenes</i>	No – revestido	4.99	4.35
		Revestido	4.99	4.09
10	<i>L. plantarum</i>	No – revestido	5.06	4.60
		Revestido	5.06	4.06

Ejemplo 5

15
20
25
30
35

Fueron preparadas soluciones de lisozima-quitosano siguiendo el método descrito en el Ejemplo 1, excepto que se usó un 2% de quitosano en lugar de un 3% de quitosano. La solución formadora de película fue fundida sobre una plancha de vidrio revestida de Teflón nivelado con una zona de 260 mm. x 260 mm. y secado a temperatura ambiente ($22.5 \pm 1^\circ \text{C}$ y $40 \pm 5\%$ de de humedad relativa {HR}) durante dos días. Las películas secadas fueron eliminadas de las planchas y cortadas a trozos con dimensiones de 65 x 30 mm. El grosor de las películas producidas fue de $85 \pm 9 \mu\text{m}$. Los trozos de película fueron almacenados en una cámara ambiental (T10RS, Tenney Environmental, Williamsport, Pennsylvania) puestos a 25°C y 50% de HR durante dos días.

El queso Cheddar (Tillamook County Creamery Association, Tillamook, Oregón) fue cortado de forma aséptica en una dimensión rectangular de 60 mm. x 26 mm. x 5 mm. e inoculado con 100 μl de *L. monocytogenes* o *L. plantarum* (de unos 2×10^3 CFU/ml). Cada loncha de queso inoculada fue emparedada entre dos trozos de película de tratamiento similar. Se consiguieron salchichas de Frankfurt de ternera fabricadas para el mercado (Bun-Lenght, Oscar Mayer Foods Corp., Madison, Wisconsin) que se cortaron en longitudes de 26 mm. (de unos 10 grs.) bajo condiciones asépticas y envasadas al vacío en una bolsa de plástico al vacío de 200 mm. x 150 mm. (FoodSaver Rolls, Tilia, Inc., San Francisco, California). Las condiciones de almacenado y la enumeración microbiana fueron los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 3.

Como se muestra en la Tabla 6, las películas de compuestos de lisozima – quitosano redujeron el crecimiento microbiano en las superficies del queso, el *L. plantarum* fue más sensible a las películas que el *L. monocytogenes*. Los tratamientos de película mostraron unas actividades antimicrobianas más fuertes que los tratamientos de revestimiento con los ejemplos de superficie de queso

Tabla 6: Efecto de aplicaciones de película sobre el crecimiento microbiano de queso cheddar en lonchas inoculado con *L. monocytogenes* o *L. plantarum*.

40	Microorganismo	Tratamiento	CFU Logarítmico/ gramo de queso	
			0 días	4 días
	<i>L. monocytogenes</i>	No – revestido	4.99	4.35
45		Revestido	4.99	3.60
	<i>L. plantarum</i>	No – revestido	5.06	4.60
50		Revestido	5.06	1.39

Habiéndose ilustrado y descrito los principios de los métodos, películas y productos alimenticios divulgados con referencia a varios ejemplos, será evidente que estos métodos, películas y productos alimenticios pueden ser modificados en detalle sin salir del ámbito marcado por dichos principios.

55

REIVINDICACIONES

1. Una película de un compuesto que incluye lisozima incorporada a una matriz de polímero de quitosano.
2. La película de la reivindicación 1 en la que todos los componentes de la misma son comestibles y renovables.
3. La película de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que el quitosano tiene un grado de deacetilación de al menos de alrededor del 70%.
4. La película de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el quitosano comprende acetato de quitosano, sorbato de quitosano, propionato de quitosano, lactato de quitosano, glutamato de quitosano, benzoato de quitosano, citrato de quitosano, maleato de quitosano, glicolato de quitosano, acrilato de quitosano, succinato de quitosano, oxalato de quitosano, ascorbato de quitosano, tartarato de quitosano, o mezclas de los mismos.
5. La película de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la lisozima está presente en una cantidad efectiva antimicrobiana.
6. La película de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la misma tiene una permeabilidad al vapor de agua de alrededor de 1 a alrededor de 300 grs. mm/m² d kPa.
7. La película de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la cantidad de lisozima es suficiente de tal forma que alrededor de 24 horas después de la aplicación de la película a un sustrato hasta alrededor del 30 % de la lisozima no ha sido liberada de la película, y después de alrededor de 48 horas hasta alrededor del 20 % de la lisozima no ha sido liberada de la película.
8. La película de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 200 de porcentaje de peso de lisozima, basado en el peso del quitosano.
9. La película de la reivindicación 8, que comprende de alrededor de 10 a alrededor de 100 de porcentaje de peso de lisozima
10. La película de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además al menos un componente adicional seleccionado de un plastificador o de un agente de reticulación.
11. La película de la reivindicación 10, comprendiendo al menos un plastificador y al menos un agente de reticulación.
12. La película de la reivindicación 10 ó de la reivindicación 11, en la que el plastificador está presente en una cantidad de alrededor de 1 a alrededor de 50 de porcentaje de peso, basado en el peso del quitosano.
13. Un método para fabricar una película, que comprende:
La disolución o la dispersión de quitosano y lisozima en un medio acuoso resultando en una solución o dispersión formadora de película;
La aplicación de la solución o dispersión formadora de película a la superficie de un sustrato;
y
La conversión de la solución o dispersión formadora de película en una película.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el quitosano se disuelve en un ácido orgánico acuoso.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el ácido orgánico acuoso se selecciona de entre ácido acético, ácido sórbico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glutámico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido glicólico, ácido acrílico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido ascórbico, ácido tartárico o mezclas de los mismos.
16. El método de la reivindicación 14 o de la reivindicación 15, en el que la lisozima se disuelve en agua resultando en una solución de lisozima, y entonces la solución de lisozima se mezcla con la solución de quitosano, o en el que la lisozima se disuelve en el agua resultando en una solución de lisozima, y entonces la solución de lisozima se mezcla con la solución de quitosano, en el que la mezcla de la solución de lisozima y la solución de quitosano tiene lugar bajo condiciones de temperatura ambiente.
17. El método de la reivindicación 16, en el que la solución de lisozima incluye de alrededor de 5 a alrededor de 20 en porcentaje de peso de lisozima.
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la conversión de la solución o dispersión formadora de película en la película tiene lugar por medio del secado.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la superficie del sustrato comprende la superficie de un producto alimenticio.
20. El método de la reivindicación 19, en el que la película incluye una cantidad efectiva antimicrobiana de lisozima, y la actividad antimicrobiana de la película dura al menos tres semanas.
21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, comprendiendo además la disolución o dispersión de al menos otro aditivo en el medio acuoso.
22. El método de cualquier de las reivindicaciones 13 a 21, comprendiendo además la colocación de la película sobre la superficie de un producto alimenticio.

- 5
- 10
- 15
- 20
23. El método de las reivindicaciones 19 ó 20, en el que la solución o dispersión formadora de película se aplica a la superficie del producto alimenticio por rociado, pincelado, goteo o bañado.
 24. Una película producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23.
 25. La película de la reivindicación 24, en la que la lisozima está presente en la película en una cantidad efectiva antimicrobiana.
 26. Un producto alimenticio que incluye una película antimicrobiana en al menos una parte de una superficie del producto alimenticio, en el que la película antimicrobiana comprende lisozima incorporada en una matriz de polímero de quitosano.
 27. El producto alimenticio de la reivindicación 26, en el que la lisozima está presente en la película en una cantidad de alrededor de 10 a alrededor de 200 en porcentaje de peso, basado en el peso del quitosano.
 28. El producto alimenticio de la reivindicación 26, en el que la película tiene una permeabilidad al vapor de agua de alrededor de 1 a alrededor de 300 grs. Mm/m² d kPa.
 29. El producto alimenticio de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que la película es fabricada por un método que comprende: disolución o dispersión de quitosano y lisozima en un medio acuoso que resulta en una solución o dispersión formadora de película; aplicación de la solución o dispersión formadora de película a la superficie de un substrato; y conversión de la solución o dispersión formadora de película en una película.

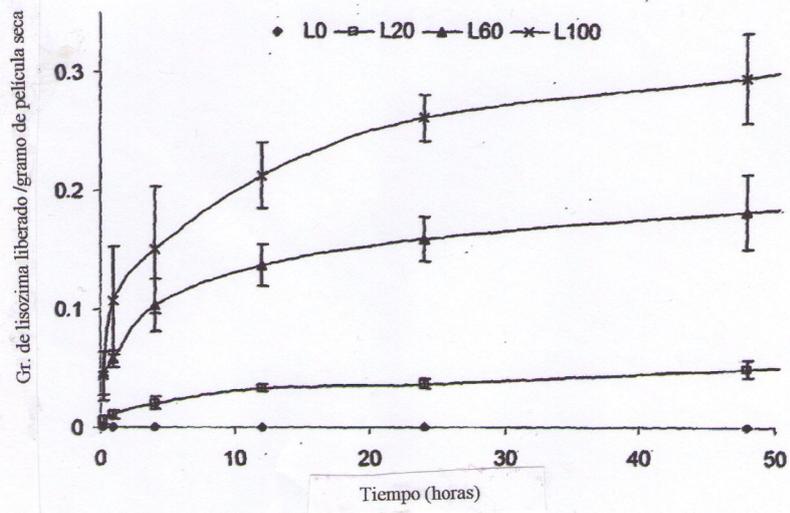


FIG. 1

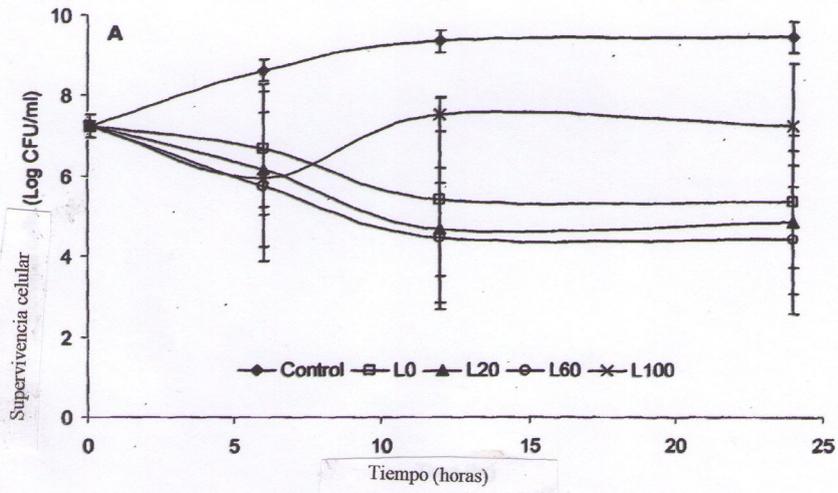


FIG. 2A

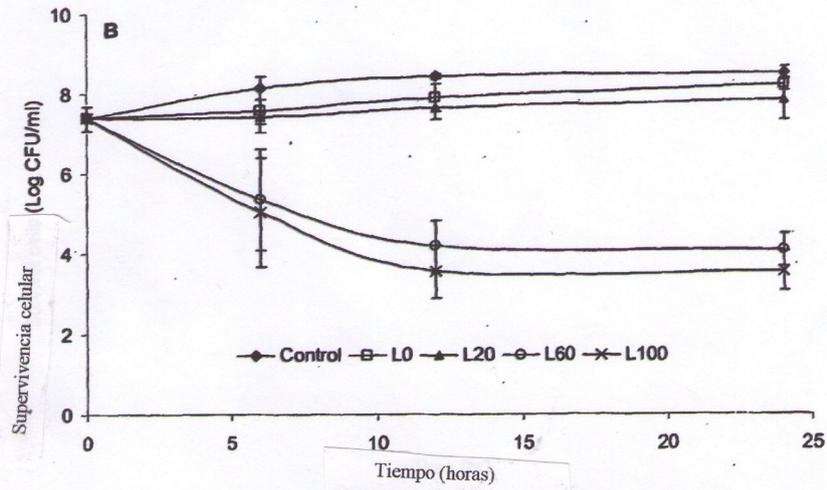


FIG. 2B

FIG. 3A

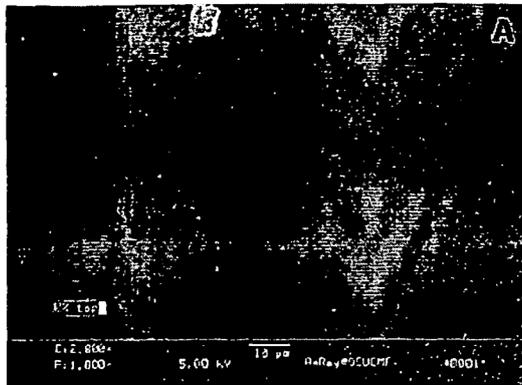


FIG. 3B

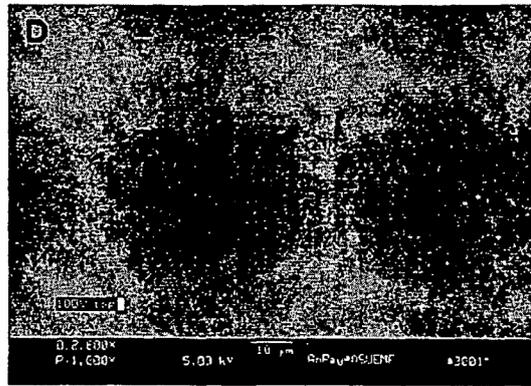
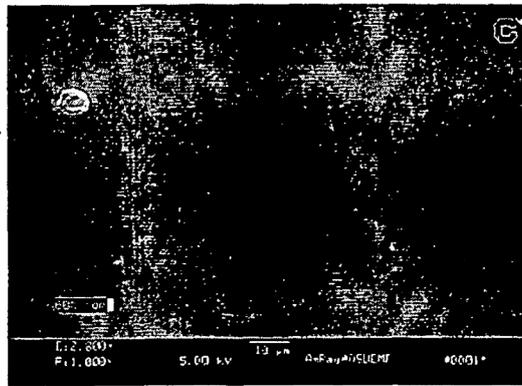
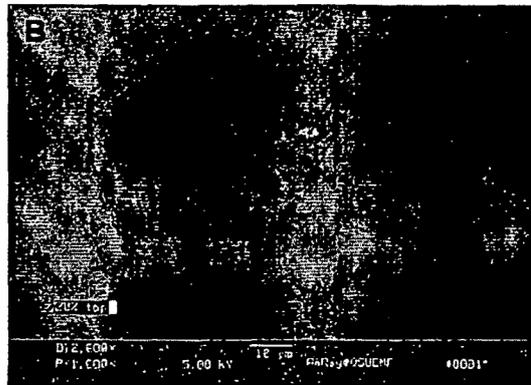


FIG. 3C

FIG. 3D

FIG. 4A

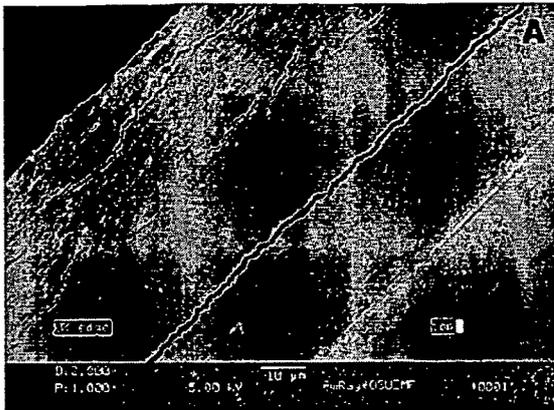


FIG. 4B

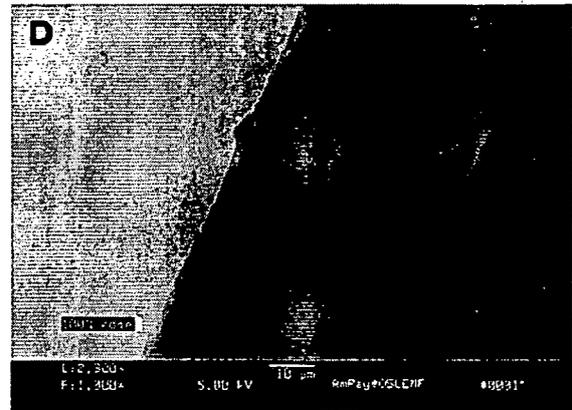
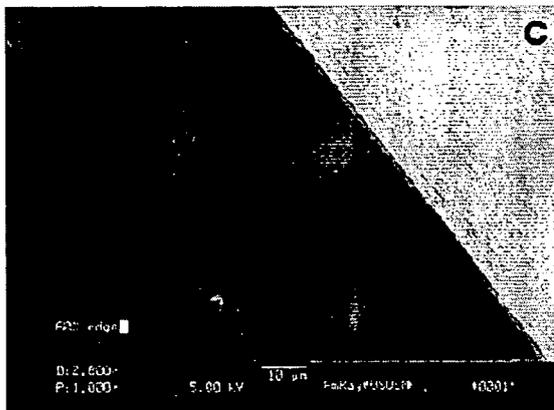
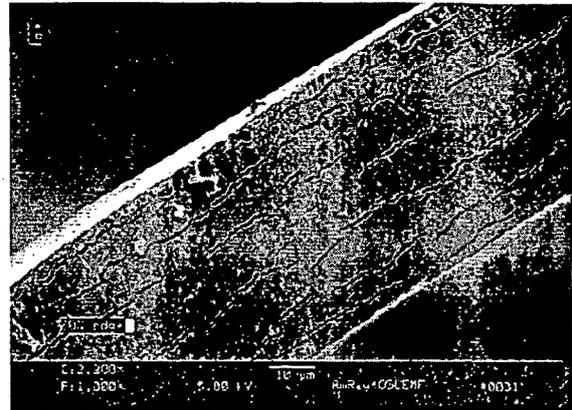


FIG. 4C

FIG. 4D