



ANÁLISIS ANTIMICROBIANO DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

M.B. Vignola, M. Serra, M. Raspo, L. Genero, L. Funes y A.E. Andreatta

Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional San Francisco
Av. de la Universidad 501, San Francisco (2400), Córdoba
E-mail: aandreatta@sanfrancisco.utn.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos ha crecido el interés por el desarrollo de materiales con capacidad de formación de película y propiedades antimicrobianas con el objetivo de alargar la vida útil de los alimentos. En este contexto, películas de quitosano han mostrado una gran promesa para su aplicación en conservación de los alimentos. El quitosano es un biopolímero natural, biodegradable, no tóxico que deriva de la desacetilación de la quitina y ha recibido considerable atención por sus aplicaciones en industrias médicas, alimenticias y químicas.

El objetivo de este trabajo consiste en la preparación de películas a base de quitosano con Tween 80 como plastificante y un compuesto bioactivo (hidroquinona o ácido salicílico) capaces de provocar un efecto inhibitorio o bactericida frente a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* MS1. La misma, se presenta como alterante de salchichas tipo Viena y cuyo crecimiento se manifiesta en el producto envasado al vacío a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración provocando hinchazón de los envases.

MÉTODOS

Materiales

Los reactivos utilizados fueron: quitosano (86.64%, Parafarm); ácido acético glacial (99.5%, Cicarelli); hidroquinona; ácido salicílico (Cicarelli); Tween 80 (Anedra). Man Rogosa y Sharpe, agar bacteriológico, solución de NaCl al 8.5%.

Preparación de films antimicrobianos

Las películas se obtuvieron mediante el proceso denominado casting, donde la mezcla de reacción obtenida de disolver 0.10 g de quitosano en buffer de acético 0.10 M a pH 4, de adicionar el compuesto bioactivo (hidroquinona o ácido salicílico) y el plastificante (Tween 80) en concentraciones conocidas, fue vertida en cajas de Petri y puesta a secar a temperatura ambiente. El plastificante se adiciona a las películas únicamente por la necesidad de mejorar las

propiedades mecánicas de las películas. Las películas ensayadas fueron las siguientes:

- Quitosano 1%
- Quitosano 1%; tween 2.5%
- Quitosano 1%, tween 2.5%; ác. salicílico 0.8%
- Quitosano 1%; tween 2.5%; hidroquinona 0.01%
- Quitosano 1%; tween 2.5%; hidroquinona 0.015%
- Quitosano 1%; tween 2.5%; hidroquinona 0.02%.

Determinación del efecto antimicrobiano de films a base de quitosano

El aislamiento de la bacteria se realizó a partir de paquetes envasados al vacío de salchicha tipo Viena que mostraron indicios de deterioro por hinchazón como consecuencia de la formación de gas. Se procedió al hisopado de la superficie de la salchicha mediante un hisopo estéril y se inoculó en caldo MRS con campana de Durham invertida. Se los incubó a 30°C por el término de 72 hs. Los tubos positivos que presentaron turbidez y formación de gas fueron repicados en MRS agarizado con posterior incubación en microaerofilia por 72 hs. Posteriormente, se aislaron colonias sospechosas y se continuó con la tipificación bioquímica y molecular de la cepa.

La actividad antimicrobiana de las películas bioactivas frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1 se evaluó mediante un test de sensibilidad utilizando la metodología descrita en la norma M02-A11 del Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), con algunas modificaciones. En resumen, pequeños trozos de películas bioactivas se colocaron en la superficie del medio de cultivo MRS agarizado al 2% en placas de Petri; previamente inoculadas con una suspensión de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* MS1 de una turbidez equivalente a un estándar de 0.5 Mc Farland (1.5 x 10⁸ CFU / ml). Dichas placas se incubaron a 30°C durante 48 h. Una película de cada preparación se cortó en tres piezas y se utilizó como réplica. Se usaron películas de quitosano y plastificante como pruebas de control negativo, en las mismas condiciones que las pruebas con las películas bioactivas.

Posteriormente, se tomó una muestra en los halos de inhibición, se sembró en placas de Petri con MRS sin

antimicrobianos y se incubó a 30 °C por 48 h. Posteriormente se observó evidencia o no de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 en las muestras, determinando si las películas bioactivas resultaron bactericidas o inhibitorias. Si no hubo crecimiento, se considera que la película bioactiva tuvo un carácter bactericida; mientras que si hubo crecimiento, la actividad de la misma fue inhibitoria.

RESULTADOS

Las películas que contenían Quitosano al 1% y Tween 80 al 2,5% no formaron un halo inhibitorio alrededor de ellas en la placa de Petri pero si se evidenció que no hubo crecimiento debajo de ellas (Figura 1). Este efecto del quitosano puede estar relacionado al hecho de que no difunde a través del medio de agar y que por lo tanto solo los microorganismos que están en contacto directo con los sitios activos del quitosano serán inhibidos (Coma *et al.*, 2002).



Fig. 1. Método de difusión de agar de películas compuestas por Quitosano 1% (superior) y Quitosano 1%; Tween 2.5% (inferior).

No se registró un efecto inhibitorio sobre la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* MS1 en presencia de películas compuestas de quitosano, Tween 80 y ácido salicílico en ninguna de las proporciones evaluadas. Sin embargo, al incorporar hidroquinona como compuesto activo a la formación de películas si se pudo apreciar el efecto antimicrobiano del mismo.

En la Figura 2, se puede observar que la película conteniendo hidroquinona al 0.015% P/P y 0.02% P/P como antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición.

Los mismos en una posterior siembra de los halos de inhibición demostraron ser películas bactericidas.



Fig. 2. Halos de inhibición en films de quitosano con 0.015 %P/P (superior) y 0.02 %P/P (inferior) de hidroquinona y 2.5% P/P de Tween 80.

CONCLUSIONES

Diferentes películas a base de quitosano han sido evaluados en la búsqueda de inhibidores y bactericidas de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* MS1, presente en salchichas tipo Viena, envasadas al vacío a partir de dos a tres semanas de almacenamiento bajo refrigeración.

De esta investigación se concluye que películas con hidroquinona pueden ser utilizadas como potencial bactericida y pueden resultar prometedores para alcanzar películas con propiedades antibacteriales para una futura aplicación como material para envoltorio de alimentos.

REFERENCIAS

- Coma, V., Martial Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. & Deschamps, A. "Edible antimicrobial films based on chitosan matrix". *Journal of Food Science*, 67, 1162–1169 (2002).
- Clinical and Laboratory Standards Institute, "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests (M02-A11); Approved Standard—Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute" (2012).