



TESIS DOCTORAL:

**Películas comestibles a base de quitosano con actividad
inhibitoria sobre microorganismos patógenos.**

Doctorando: Ing. Valeria Carina Bordagaray

Directora: Dra. Liliana Mabel Gerard

Co-directora: Dra. Patricia Daniela Zgolicz

RESUMEN EXTENDIDO

En la actualidad se encuentra en auge el desarrollo de nuevas tecnologías de envases biodegradables y comestibles para controlar el crecimiento microbiano, mantener la calidad y la seguridad de los alimentos. Una alternativa es el uso de envases activos con agentes antimicrobianos, que permite reducir su adición en la formulación del alimento y prevenir el crecimiento microbiano en la superficie, donde se produce la mayor contaminación. Algunos polímeros son antimicrobianos y se han utilizado en películas y recubrimientos, como el quitosano (Q), un polímero catiónico derivado N-deacetilado de la quitina. El Q posee actividad antimicrobiana, es biodegradable, biocompatible, no es tóxico y tiene capacidad de formar películas, de manera que su uso en la producción de envases activos permite disminuir el impacto ambiental de los residuos plásticos. Las películas de Q presentan permeabilidad selectiva a los gases, buenas propiedades mecánicas pero elevada permeabilidad al vapor de agua. Sus propiedades funcionales pueden mejorarse por la combinación con otros hidrocoloides. De los biopolímeros naturales, el almidón (A) es uno de los más usados, es abundante, de bajo costo, renovable y biodegradable. Varios investigadores han reportado que A y Q forman películas homogéneas y con propiedades mejoradas frente a los componentes individuales. Entre los compuestos naturales antimicrobianos que se pueden incorporar a películas comestibles, se encuentran los aceites esenciales (EO). Su actividad antimicrobiana en microorganismos patógenos ha sido estudiada, sin embargo su incorporación en películas de uso alimentario, ha sido bastante limitada.

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar y caracterizar películas comestibles a base de Q, A y EO de producción nacional con actividad inhibitoria sobre bacterias patógenas, para ser aplicadas como parte del empaque de alimentos. Según la OMS, Argentina tiene la mayor tasa de incidencia de Síndrome Urémico Hemolítico del mundo, con 300 a 500 nuevos casos cada año, siendo la población de niños menores de 5 años la más afectada, con una tasa aproximada de 10 casos cada 100000 niños por año. El agente etiológico más comúnmente asociado a SUH es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7 y su principal reservorio es la carne vacuna. La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) señala que la carne fresca, además, puede contener otros microorganismos patógenos, entre los cuales se encuentra *Salmonella* spp. Considerando este alimento como foco de estudio, se evalúa el efecto inhibitorio de las películas sobre dos bacterias patógenas relevantes: *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium.

Para cumplir con el objetivo general, las actividades experimentales se dividieron en etapas. La primera etapa consistió en la definición de la proporción de Q y A a utilizar como matriz de las películas. Se prepararon suspensiones con distintas proporciones de los polímeros, utilizando glicerol como plastificante y a partir de éstas, las películas por método casting. Se les determinó: color, con un colorímetro CR-300 (Minolta, Japón) y escala CIELAB; espesor, con un medidor CEM DT-156 (China); propiedades mecánicas

de tracción y punción, usando un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra); solubilidad en agua a 25°C; humedad, por pérdida de peso de la película a 105°C; y permeabilidad al vapor de agua (WVP), con el método ASTM E96 (ASTM 2012) y copas de permeación (Payne Elcometer 5100, Manchester, UK). Se observó que el agregado de A contribuyó a mejorar la extensibilidad, la WVP y la solubilidad en agua de las películas, respecto a las logradas con Q sólo. De acuerdo a los resultados obtenidos se opta por la composición QA50-50 para continuar los estudios.

En la segunda etapa se efectuó un screening de diez EO, a fin de evaluar la sensibilidad de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium a esos aceites. Luego, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los más activos (menta, eucalipto y pomelo blanco). Para el screening se utilizó el método de difusión en agar y para la determinación de la MIC, el de dilución en agar. Teniendo en cuenta que el EO de pomelo presentó un aroma menos intenso e invasivo y que en la amplia bibliografía consultada no se encontraron los efectos antimicrobianos de la adición del mismo en películas, se decidió continuar trabajando con este EO.

En la tercera etapa se determinó la actividad antimicrobiana de las películas de Q, A y EO de pomelo blanco. Inicialmente, se evaluó el efecto inhibitorio “in vitro” de las películas con y sin agregado de EO mediante el método de difusión en agar. Posteriormente, las películas a base de A y las de QA, sin aceite y con concentraciones de aceite variables, se aplicaron sobre discos de carne vacuna inoculada con las bacterias en estudio (a una concentración superficial de 6 log UFC.cm⁻²) y se evaluó su efecto tras 5 días de almacenamiento a 5°C±1°C. Frente a los resultados obtenidos se pudo deducir que las películas QA50-50 ejercerían control del crecimiento de *E. coli* O157:H7, en carne vacuna fresca. Los ensayos realizados no evidenciaron mejora del efecto inhibitorio con el agregado de EO, por lo tanto, la acción inhibitoria estaría dada por el Q, por contacto directo con las células microbianas. Para el caso de *S. Typhimurium*, el efecto de control sobre su crecimiento en la carne fue variable. Aunque se observó reducción de la carga superficial con el paso del tiempo cuando se utilizaron las películas compuestas, no se pudo demostrar una correlación con el agregado de EO.

En la cuarta etapa se caracterizaron las emulsiones formadoras de película y las películas resultantes. Para ello, se prepararon las emulsiones a base de Q, A y EO de pomelo al 1%, 2% y 3%. Se obtuvo la distribución y tamaño de partículas (diámetro promedio de Sauter, d_{3,2}) en un Mastersizer 2000 Malvern (Worcestershire, UK) y se determinó la estabilidad global de las emulsiones en un Turbiscan Classic Formulation (L'Unión, Francia), a tiempo 0 y 7 días. En todas las composiciones la distribución de tamaños de gotas fue bimodal con un pico a 0,18 µm y otro a 1,44-1,66 µm. A mayor concentración de EO, el tamaño de partículas se incrementó. Respecto a la estabilidad, no se evidenciaron mecanismos de desestabilización de las emulsiones y resultaron estables a través del tiempo. Se efectuó la determinación de las propiedades físicas, mecánicas, de barrera y de microestructura de las películas compuestas obtenidas con las emulsiones. Se les determinó color, espesor, propiedades mecánicas de tracción y punción, WVP, solubilidad y

humedad. El análisis de la microestructura se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA, CONICET-UNMdP). Los difractogramas de rayos X (XRD) se obtuvieron con un difractómetro PANalytical X'Pert Pro (Almelo, Países Bajos), los espectros FTIR, en un espectrofotómetro de infrarrojos IAFfinity-1S FTIR (Shimadzu, Japón) y la morfología de las películas en un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6100 (Japón). Las películas presentaron resistencia a la tracción similar a algunos materiales de envasado sintéticos, aunque menor flexibilidad, y mayor WVP. En los espectros FTIR se observó la interacción de los grupos hidroxilo del A con los grupos amino del Q, y ante el agregado de EO, no hubo evidencia de reacciones químicas entre los componentes. Las micrografías de las secciones transversales de las películas sin EO mostraron una estructura suave y compacta, sin grietas ni poros, que demuestra la compatibilidad y miscibilidad de los polímeros. En contraste, la microestructura de las películas con EO fue heterogénea, presentando poros originados a partir de las gotas de aceite en la emulsión formadora de película. Las discontinuidades generadas por la presencia de las gotas, influyeron en las propiedades de barrera, reduciendo la WVP.

En la última etapa se evaluó el efecto de las películas de composición A100, QA50-50 sin y con EO de pomelo al 3% en la conservación de carne vacuna fresca, considerando el crecimiento de bacterias aerobias mesófilas y *Pseudomonas aeruginosa*, el pH y los parámetros de color al inicio y luego de 2, 4, 6, 8 y 10 días de almacenamiento a $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los recuentos de bacterias aerobias mesófilas para las muestras sin película (C) y con A100 aumentaron con el paso del tiempo, mientras que en las muestras con películas con QA, se redujeron y mantuvieron por debajo de $2 \log \text{ UFC.cm}^{-2}$ aún tras 10 días de almacenamiento. Similar tendencia se observó para los recuentos de *P. aeruginosa*. El agregado de EO, no mejoró el efecto frente a las películas con Q y A sin EO. Respecto al pH, las películas de Q y A lo mantuvieron estable y bajo (5,92 frente a 7,01-7,75 de los tratamientos C y A100). A su vez, se observó una mejora en la estabilidad del color al usar las películas. Las películas a base de Q y A ejercieron un muy buen efecto en la conservación de la carne, inhibiendo marcadamente el crecimiento de microorganismos alterantes y manteniendo los parámetros pH y color en valores aceptables por más tiempo.

En la presente tesis doctoral fue posible obtener películas antimicrobianas comestibles a base de los polímeros naturales Q y A, con una matriz homogénea, estructura estable y mejoradas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. Resultaron efectivas para el control del crecimiento de *E. coli* O157:H7 sobre la superficie de carne vacuna fresca y mejoraron sustancialmente su conservación en refrigeración. Se considera factible su aplicación, en combinación con otras tecnologías de conservación, en el almacenamiento de alimentos de este tipo.