

## **DESARROLLO DE PELÍCULAS PLÁSTICAS ANTIMICROBIANAS CON IONES PLATA PARA EL ENVASADO ACTIVO DE EMBUTIDOS**

Jairo H. Patiño<sup>1\*</sup>, Luis E. Henríquez<sup>1</sup>, María P. Mendoza<sup>2</sup>, María I. Lantero<sup>3</sup> y Mario A. García<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAL), Carrera 50 G No. 12 Sur-91. Itagüí, Colombia.

\*E-mail: [director@fundacionintal.org](mailto:director@fundacionintal.org)

<sup>2</sup>Alico S.A. Calle 10 Sur 50FF 63, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600.  
La Habana, Cuba.

### **RESUMEN**

La actividad antimicrobiana de los iones Ag<sup>+</sup> se estimó por el método de la concentración mínima inhibitoria para cepas microbianas seleccionadas por su relación con el deterioro de productos cárnicos, mientras la de las películas activas con iones Ag<sup>+</sup> mediante el método de difusión en agar y en medio líquido. Además, se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido y análisis termodinámico mecánico. La incorporación de plata en una concentración de 3 % no alteró la estructura y propiedades térmicas de los materiales plásticos elaborados. Los iones Ag<sup>+</sup> inhibieron el crecimiento de varias cepas microbianas, resultando la de *S. typhimurium* ATCC 14028 la que presentara mayor resistencia, lo que demuestra el potencial antimicrobiano de la plata. Aunque las películas antimicrobianas con plata no mostraron efectos inhibidores, debe tenerse en cuenta su potencial como envases para alimentos para incrementar la seguridad alimentaria y vida útil.

**Palabras clave:** embutidos, envasado activo, iones plata, actividad antimicrobiana.

**\*Jairo Humberto Patiño Gómez:** Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Antioquia (1998). Master en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de La Habana (2004). Maestría en Administración de Proyectos, Universidad para la Cooperación Internacional (2008). Maestría en Desarrollo Local, Universidad Complutense de Madrid (2008). Se desempeña como Director General del Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria (INTAL). Actualmente opta por el grado científico de Doctor en Ciencias de los Alimentos por la Universidad de La Habana, con el tema relacionado con el mejoramiento de la calidad e inocuidad de los embutidos cárnicos mediante el desarrollo de envases activos.

### **ABSTRACT**

#### **Development of antimicrobial plastic films with silver ions for active packaging of sausages**

The antimicrobial activity of the Ag<sup>+</sup> ions was assessed by the minimum inhibitory concentration method for microbial strains selected for their relationship with the spoilage of meat products, while the films active with Ag<sup>+</sup> ions by agar diffusion and liquid medium methods. Moreover, were characterized by differential scanning calorimetry and mechanical thermodynamic analysis. The incorporation of silver in a concentration of 3 % did not alter the structure and thermal properties of the plastics products. Ag<sup>+</sup> ions inhibited the growth of various microbial strains, resulting in the *S. typhimurium* ATCC 14028 which present greater resistance, demonstrating the potential antimicrobial silver. Although antimicrobial silver films showed no inhibitory effects should be taken into account their potential as food packaging to increase food security and life.

**Keywords:** sausages, active packaging, silver ions, antimicrobial activity.

### **INTRODUCCIÓN**

Los envases antimicrobianos constituyen una forma promisorio de envase activo de alimentos, en particular para productos cárnicos. La aplicación directa de sustancias antibacterianas en las superficies de los embutidos tiene beneficios limitados, porque las sustancias activas se neutralizan cuando entran en contacto con el alimento o difunden rápidamente a su interior. Por otra parte, la incorporación de agentes bactericidas o

bacteriostáticos en formulaciones de productos cárnicos puede resultar en la inactivación parcial de las sustancias activas por los constituyentes de los productos y por lo tanto se espera que tenga solo un efecto limitado sobre la microflora en la superficie.

Las sustancias antimicrobianas incorporadas en los materiales de envasado pueden controlar la contaminación microbiana mediante la reducción de la tasa de crecimiento y ampliación de la fase de latencia del microorganismo diana, o mediante la inactivación de microorganismos por contacto. La inclusión de sustancias antimicrobianas en películas plásticas tiene el propósito de su liberación gradual en la superficie del producto para inhibir el crecimiento de microorganismos y aumentar la vida útil y seguridad del producto (1).

La plata es un metal con propiedades antimicrobianas conocidas. A bajas concentraciones no causa toxicidad y su uso puede reducir los problemas de resistencia debido a las bacterias resistentes (2-5). Los iones de plata inactivan las proteínas de la membrana, lo que resulta en daño en el ADN. También, ayudan en la generación de especies químicas reactivas al oxígeno, forman complejos con azufre, nitrógeno y oxígeno, dañando el mecanismo de división celular (6-9). Las propiedades antimicrobianas de la plata a menudo están relacionadas con la cantidad y tasa de liberación de iones  $Ag^+$  a partir de los materiales. En su estado metálico es inerte, pero puede reaccionar con la piel o humedad de los alimentos para formar iones  $Ag^+$  activos (2,10,11).

Aunque se reportan algunas investigaciones concernientes a la aplicación de compuestos de plata en películas poliméricas como polipropileno (12), poliuretano (13) y polilactida (14), la impregnación de películas plásticas con agentes antimicrobianos es aún escasa en la literatura científica. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar películas plásticas antimicrobianas con iones  $Ag^+$  para el envase activo de embutidos cárnicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antimicrobiana de los cristales de  $Ag^+$  inorgánicos en polvo suministrados por Clariant S.A. se realizó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), usando las siguientes

cepas microbianas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Penicillium chrysogenum* ATCC 8507, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028, seleccionadas por su relación con el deterioro de los productos cárnicos. La CMI se determinó por el método indirecto basado en la estimación del crecimiento microbiano por turbidez en el cultivo en medio líquido (1).

La preparación de las cepas bacterianas y diluciones se realizó a partir de los cultivos de trabajo de cada una de las cepas de estudio, sembradas en caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Merck), de los que se tomó un inóculo y sembró por aislamiento en agar TSA (*Trypticase Soy Agar*, Merck), incubadas a  $36 \pm 2$  °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se tomaron colonias aisladas de cada microorganismo y se inocularon en tubos con 10 mL de agua peptona estéril (0,1 %) y se ajustó cada una de las anteriores hasta obtener una turbidez en cada tubo (cultivo madre), similar a la turbidez del patrón McFarland 0.5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/mL). La lectura de la turbidez se realizó utilizando una plantilla con patrones lineales negros de diferente tamaño y comparando el patrón con el tubo de la suspensión bacteriana.

A partir del cultivo madre se prepararon las diluciones seriadas decimales hasta 10<sup>-3</sup>, donde 1 mL del cultivo se inoculó en un frasco con 9 mL de agua peptona estéril correspondiendo a la dilución 10<sup>-1</sup> y así consecutivamente hasta la dilución 10<sup>-3</sup>; se sembró cada microorganismo de la última dilución en agar TSA e incubó a  $36 \pm 2$  °C durante 24 h para realizar el recuento y confirmar la concentración del inóculo. Paralelamente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS a 620 nm usando como blanco el caldo TSB (*Trypticase Soy Broth*, Merck) y como muestra cada cepa bacteriana comparada con el patrón 0.5 de la escala McFarland (NTC 2455). Se realizó la lectura de absorbancia de la dilución hasta 10<sup>-3</sup> de cada cepa microbiana y sembró en placa profunda en agar TSA, incubadas a  $36 \pm 2$  °C durante 24 h para confirmar el inóculo de trabajo.

Para la preparación de las diluciones para determinar la CMI se usaron 12 tubos con 4 mL de caldo TSB. Al tubo número 1 se le adicionó 0,4 g del agente activo y se homogenizó hasta disolverlo completamente. Del tubo 1 se transfirieron 2 mL al segundo tubo con caldo

TSB y así sucesivamente hasta completar los 12 tubos con el objetivo de obtener concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano. Del último tubo se descartaron 2 mL de la disolución. Posteriormente se inocularon 100 µL de cada microorganismo en evaluación se inocularon en cada tubo (de la serie de 12) a partir de la dilución 10<sup>-3</sup>. Se tomó un tubo control que solamente contenía medio de cultivo TSB y se inoculó. Todos los tubos fueron incubados durante 48 h a 36 ± 2 °C. Después de la incubación se realizó la lectura de los tubos y la ausencia de turbidez en el caldo TSB demostró un resultado positivo para la inhibición bacteriana por los cristales de plata. Los tubos donde se evidenció turbidez fueron confirmados sembrando 1 mL en profundidad en agar TSA. La CMI se expresó mg/L y el resultado se reportó tomando el tubo inmediatamente anterior al cual hubo crecimiento de microorganismos.

Considerando los materiales que se utilizan para embutidos de res y pollo, se desarrollaron dos tipos de fundas plásticas impermeables (Nylon-6 y PA-6 con 64 µm de espesor) mediante extrusión de burbujatubular (130 °C-14000 kPa), identificadas según la distribución de capas como tratamiento patrón (PA/adhesivo/PE-pigmento/adhesivo/PA del exterior al interior), y tratamiento con iones Ag<sup>+</sup>, incorporando un 3 % (m/v) de cristales inorgánicos en la capa interna del material, como agente antimicrobiano.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar. A partir de un inóculo de concentración conocida, se adicionan 100 µL de la dilución 10<sup>4</sup> en placas Petri con agar Müeller-Hinton (Merck) y con un asa de hockey estéril se homogenizó el inóculo en la superficie del agar y se colocan asépticamente sobre la superficie del medio, discos de 6 mm de diámetro de la muestra del material y se incuban por 24 h a 36 ± 2 °C. Los halos con ausencia de crecimiento se consideran positivos para la actividad microbicida del agente antimicrobiano. Asimismo, se evaluó la actividad bactericida en medio líquido mediante la introducción de muestras de 10 cm<sup>2</sup> de los materiales, en tubos con 10 mL de TSB. Los tubos se inocularon con 1 mL de la suspensión microbiana determinada e incubados a 36 ± 2 °C; los recuentos se realizaron al inicio y a los 10; 20 y 30 días. Los resultados se expresaron en porcentaje de reducción durante el tiempo de incubación.

Además, el material polimérico fue caracterizado por calorimetría diferencial de barrido (DSC-2920, TA Instruments) en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 50 mL/min, con ciclos de calentamiento de 10 °C/min hasta una temperatura máxima de 200 °C, sostenida por 5 min, para luego enfriar a una velocidad controlada de 10 °C/min y análisis termodinámico mecánico (DMA-Q800, TA Instruments), con una lámina de 17,0 x 6,0 mm y espesor 0,05 mm; previo acondicionamiento en estufa a 40 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados de la CMI de los cristales inorgánicos de plata. Se observa que la concentración mínima a la cual el agente activo inhibe el desarrollo microbiano correspondió a 2,5 % para *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. chrysogenum* ATCC 8507, 5 % para *L. acidophilus* ATCC 4356 y *L. monocytogenes* ATCC 19112 y 10 % para *S. tiphymurium* ATCC 14028, cepa que presentó la mayor resistencia a la acción bacteriostática de los iones Ag<sup>+</sup>, lo que se corresponde con lo informado (15), lo que puede deberse a que en bacterias Gram negativas, los biocidas son bloqueados cuando alcanzan blancos específicos en la membrana bacteriana externa relacionados con la activación de las bombas proteicas de iones dependientes de energía (16, 17); también se ha reportado que en mutantes de *E. coli* existió una mayor resistencia por una disminución de la permeabilidad de la membrana externa (16), causada por la formación de pozos de forma irregular y una progresiva liberación de lipopolisacáridos y proteínas de la membrana, debidas en primera instancia a la reducción del metal (18).

Otro de los mecanismos de acción de los iones Ag<sup>+</sup> plantea que estos son primeramente adsorbidos por la superficie de las células microbianas e incorporados a las células por transporte activo, reaccionan con las enzimas e inhiben procesos metabólicos necesarios para el sostenimiento celular (19). Otros trabajos (20, 21) informan que la actividad antimicrobiana de los iones Ag<sup>+</sup> se debe a la atracción electrostática entre la membrana celular del microorganismo con carga negativa y las partículas cargadas positivamente.

**Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de los cristales inorgánicos de plata**

Microorganismo	Dilución (mg/L)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	100000	50000	25000	12500	6250	3125	1562,5	780	390	190
<i>S. tiphymurium</i> ATCC 14028	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i> ATCC 8507	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Otros trabajos (22) informan que las levaduras y *E. coli* son inhibidos a concentraciones bajas de nanopartículas de plata, mientras que *S. aureus* no se inhibió a ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados fueron relacionados con la generación de radicales libres que pueden atacar la membrana lipídica y disminuir sus funciones, aunque el efecto es específico para cierto tipo de microorganismos, dada la especificidad del contenido de peptidoglicanos en cada una de las membranas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas, tanto por el método de difusión en agar como en medio líquido, no fueron los

esperados teniendo en cuenta los resultados de la CMI para cada una de las cepas microbianas. Estos resultados pueden deberse a la no migración de los iones  $Ag^+$  en el medio de cultivo, característica de este tipo de agente antimicrobiano, cuya acción microbicida es principalmente por contacto en superficie (1).

Para el caso de la evaluación por DMA (Tabla 2), no se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el material para salchichón de pollo patrón y con aditivo, para la temperatura de transición vítrea y módulo de almacenamiento, lo cual sugiere que la adición del componente antimicrobiano no produjo cambios en

**Tabla 2. Ensayo DMA para los materiales para fundas de salchichones de pollo y res, con y sin iones  $Ag^+$**

Material de funda	Tg (°C)	Módulo de almacenamiento	Módulo de pérdida
Salchichón de pollo sin iones $Ag^+$	83,5 (0,5)	1786 (193)	144 (5) b
Salchichón de pollo con iones $Ag^+$	83,8 (0,6)	1925 (56)	154 (3) a
Salchichón de res sin iones $Ag^+$	86,0 (2,0)	1404 (160)	104 (13)
Salchichón de res con iones $Ag^+$	84,4 (0,8)	1414 (95)	111 (7)

Tg = temperatura de transición vítrea.

Media (desviación estándar). n = 3.

Letras diferentes indican diferencia significativa para  $p \leq 0,05$ .

estas propiedades termodinámicas, mientras que el módulo de pérdida sí presentó diferencias ( $p \leq 0,05$ ), aunque carecen de poca importancia práctica.

Asimismo, no se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), entre el material para salchichón de res patrón y con aditivo, para la temperatura de transición vítrea, módulo de almacenamiento y módulo de pérdida, lo cual indica que la adición del componente antimicrobiano, no produjo cambios en estas propiedades termodinámicas en el material de empaque del salchichón de res.

Los dos tratamientos de ambos materiales de fundas para salchichones de pollo y res, presentaron un termograma dinámico mecánico característico de las poliamidas, con lo cual se puede afirmar que la inclusión de los iones  $Ag^+$  no modificó esta propiedad termodinámica.

Los resultados de la DSC para ambos materiales, el empleado como funda para los salchichones de pollo y res, respectivamente, no se diferenciaron ( $p \leq 0,05$ ) con la adición o no de los iones  $Ag^+$ , al presentar valores de temperatura de transición vítrea (media (DS);  $n = 3$ ) de

123 (2) y 119 (1) °C para los materiales para salchichón de pollo patrón y con aditivo, respectivamente, y de 125 (3) y 124 (2) °C para los materiales para salchichón de res patrón y con aditivo, respectivamente. Los dos tratamientos de ambos materiales de fundas para salchichones de pollo y res, mostraron un termograma característico de las poliamidas (Fig. 1), por lo que la inclusión de los iones  $Ag^+$  no alteró esta propiedad termodinámica de los materiales.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la incorporación de plata en una concentración de 3 % no alteró la estructura y propiedades térmicas de los materiales plásticos elaborados. Los iones  $Ag^+$  inhibieron el crecimiento de varias cepas microbianas, resultando la de *S. typhimurium* ATCC 14028 la que presentara mayor resistencia, demostrando el potencial antimicrobiano de la plata. Aunque las películas antimicrobianas con plata no mostraron efectos inhibidores, debe tenerse en cuenta el potencial para su aplicación en envases para alimentos, con el objetivo de incrementar la seguridad alimentaria y vida útil.

## REFERENCIAS

1. Boschetto, D. L.; Lerin, L.; Cansian, R.; Castellã, S. B. y Di Luccio, M. Chem. Eng. J. 204-206: 210-216, 2012.
2. Castellano, J. J.; Shafii, S. M.; Ko, F.; Donate, G.; Wright, T. E. y Mannari, R. J. Int. Wound J. 4: 114-122, 2007.
3. Garza, R. M.; Olguín, M. T.; Sosa, I.G.; Alcántara, D. y Fuentes, G. R. Micropor. Mesopor. Mater. 39: 431-444, 2000.
4. Kawahara, K.; Tsuruda, K.; Morishita, M. y Uchida, M. Dent. Mater. 16: 452-455, 2000.
5. EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to a 7th list of substances for food contact materials (Question No. EFSA-Q-2003-076, EFSA-Q-2004-144, EFSA-Q-2004-166, EFSAQ-2004-082, EFSA-Q-2003-204, EFSA-Q-2003-205, EFSA-Q-2003-206). EFSA J. 201: 1-28, 2005.
6. Oliveira, L. M. y Oliveira, P. A. P. L. V. Braz. J. Food Technol. 7: 161-165, 2004.
7. Matsumura, Y.; Yoshikata, K.; Kunisaki, S. y Tsuchido, T. Appl. Microbiol. 69: 4278-4281, 2003.
8. Awuah, B. K.; Williams, C. M.; Kenward, A. y Kenward, I. R. J. Appl. 104: 1364-5072, 2007.
9. Damm, C.; Munstedt, H. y Rosch, A. Mater. Phys. 108: 61-66, 2008.
10. Landsdown, A. B. G. J. Wound Care 11: 125-138, 2002.
11. Lalueza, P.; Monzón, M.; Arruebo, M. y Santamaria, J. Chem. Commun. 47: 680-682, 2011.
12. Pehlivan, H.; Balköse, D.; Ülkü, S. y Tihminlioglu, F. Compos. Sci. Technol. 65: 2049-2058, 2005.
13. Kamisoglu, K.; Aksov, E. A.; Akata, B.; Hasirci, N. y Baç, N. J. Appl. Pol. Sci. 110: 2854-2861, 2008.
14. Zampino, D.; Ferreri, T.; Puglisi, C.; Mancuso, M.; Zaccone, R.; Scaffaro, R. y Bernardo, D. J. Mater. Sci. 46: 6734-6743, 2011.
15. McHugh G. L.; Moellering, R. C.; Hopkins, C. C. y Swartz, M. N. Lancet 1: 235-240, 1975.
16. Li, X. Z.; Nikaido, H. y Williams, K. E. J. Bacteriol. 179 (19): 6127-6132, 1997.
17. Silver, S. y Phung, L. T. Annu Rev Microbiol. 50: 753-89, 1996.
18. Amro, N. A.; Kotra, L. P.; Wadu-Mesthrige, K.; Bulychev, A.; Mobashery, S. y Liu, G. Langmuir 16: 2789-2796, 2000.
19. Zhao, G. J. y Stevens, S. E. Bimetals 11: 27-32, 1998.
20. Hamouda, T. y Baker, J. R. J. Appl. Microbiol. 89: 397-403, 2000.
21. Dibrov, P.; Dzioba, J.; Gosink, K. K. y Hase, C. C. Antimicrob Agents Chemother, 46: 2668-70, 2002.
22. Kim, S. H.; Lee, H. S.; Ryu, D. S.; Choi, S. J. y Lee, D. S. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 39 (1): 77-85, 2011.