

Desarrollo tecnológico de envases activos para la industria alimenticia

Germán Charles^{1*}, Pablo Gabriel Manzo¹, Ricardo Javier Toselli¹, Miriam Cristina Strumia²

Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP)

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Argentina¹

Resumen

El presente trabajo involucra el desarrollo de películas flexibles antimicrobianas con potencial aplicación como envases activos. Éste tuvo su origen en la presentación a un proyecto de innovación tecnológica integrado en red (PIR). Para dicha presentación, se constituyó un equipo de trabajo en el cual participó una empresa del rubro alimenticio, grupos de investigación y vinculación de la Facultad de Ciencias Químicas y una dependencia gubernamental de nivel provincial. El objetivo concreto de ese equipo de trabajo y del proyecto en sí mismo, fue el de llevar a cabo el desarrollo y la transferencia de una aplicación biotecnológica innovadora en el área de alimentos y biomateriales, que estuviese dirigida a la conservación de cierta clase de productos a través de nuevas tecnologías de envasado activo.

Palabras claves: envases activos, natamicina, polipropileno

¹gercharles@gmail.com

1. Introducción

La tecnología de los envases antimicrobianos, se presenta como una eficiente solución a diferentes inconvenientes vinculados a las técnicas tradicionales de conservación de alimentos. Para obtener este tipo de envases activos, es necesario la incorporación en el material, de un agente bioactivo específico.

Este trabajo involucra la obtención de películas modificadas de BOPP, que sean capaces de inhibir o retardar el desarrollo de mohos y levaduras sobre la superficie en contacto. Para ello se llevó a cabo la modificación superficial del polímero en cuestión, se incorporó un agente antifúngico y se efectuaron los correspondientes ensayos microbiológicos a los fines de evaluar su efectividad como posible material para ser utilizado como envase antimicrobiano.

La NAT, también conocida como pimaricina, es el agente antimicrobiano seleccionado para el presente trabajo, es un antifúngico natural producido por *Streptomyces natalensis*, comúnmente utilizado en la industria alimenticia como inhibidor del crecimiento de mohos y levaduras. El mismo ha sido aprobado como aditivo alimentario por más de 40 países, que incluye Argentina, a través del Código Alimentario Argentino.

2. Métodos

2.1 Materiales y equipos

Polipropileno comercial biorientado (BOPP), (CONVERFLEX; ARGENTINA) de 20 μm de espesor, con previo tratamiento corona. Natamicina 100% (PROQUIGA S.A.). Espectrofotómetro UV-Visible T-60 (PG Instrument). Acido acrílico (AA), (SIGMA-ALDRICH); Benzofenona (BF), (SIGMA-ALDRICH); Lámpara de Hg de baja presión NNI 20/40. Espectroscopio IR-ATR con transformada de Fourier (FT IR-ATR), (AVATAR, PERKIN ELMER). Queso fresco (DUY-AMIS).

2.2 Fotoinjerto de AA en películas de BOPP comercial

Las reacciones de modificación mediante radiación UV se llevaron a cabo en un sistema constituido por el sustrato polimérico en forma de película (BOPP), puesto en contacto con una solución al 50% del monómero (AA) y BF (0,1 M). Dichas reacciones, fueron realizadas en un fotorreactor equipado con una lámpara de mercurio de baja presión (40 W) ubicada a una distancia de 12 cm de la película. Las reacciones de injerto fueron llevadas a cabo modificando el tiempo de irradiación UV, a fin de mantener

constante la concentración de BF y AA. Posteriormente, las películas fueron enjuagadas con NaOH y H₂O destilada, a los fines de neutralizar y remover los excedentes de monómero y homopolímero.

Para establecer el grado de modificación de las películas tratadas (BOPP-g-AA), se determinó el porcentaje de injerto (%G) de las mismas, utilizando la ecuación 1:

Ecuación 1:

Donde m (BOPP-g-AA) corresponde a la masa del co-polímero de injerto y m (BOPP) a la masa de sustrato sin modificar.

La caracterización químico estructural de las películas injertadas, se llevó a cabo utilizando FT IR-ATR.

2.3 Inmovilización de NAT en BOPP-g-AA

Se inmovilizó la NAT sobre una superficie activa de BOPP-g-AA, con un porcentaje de injerto del 2%. Para esto, se sumergió dicha película en una solución (pH=8) de concentración 24 µg/mL de NAT por 24hs. Transcurrido este tiempo, la película injertada y tratada con NAT (BOPP-g-AA + NAT), fue lavada con agua destilada y secada a temperatura ambiente.

2.4 Películas bioactivas. Eficiencia antifúngica frente a *S. cerevisiae* y *A. niger*

Para evaluar la efectividad antifúngica de las películas desarrolladas, se realizaron ensayos de difusión en medio de cultivo y ensayos de inhibición sobre la matriz real de un queso fresco.

El ensayo de difusión en cápsula de petri, se llevó a cabo sobre un medio de cultivo específico para mohos y levaduras (M y L). La superficie del mismo fue inoculada con una suspensión de *S. cerevisiae* (2. 10⁶ UFC/mL) para luego depositar sobre la misma, discos de 2 cm de diámetro de las películas BOPP-g-AA + NAT. Las placas fueron incubadas 24 hs a 37 °C. Posteriormente se realizó el recuento de las colonias microbianas presentes.

Para llevar a cabo el ensayo de inhibición sobre el alimento, se utilizó queso fresco como matriz alimenticia. Sobre la superficie de una porción del mismo, (6 x 23) cm² x 1 cm de espesor, se distribuyó homogéneamente un inóculo mixto de *S. cerevisiae* (1.9 .10⁶ UFC/mL) y *A. niger* (0.3 .10⁶ UFC/mL). Posteriormente, cuadrados de 4 cm de lado, de BOP-g-AA + NAT fueron dispuestos sobre la superficie del alimento, junto a películas comerciales de BOPP sin tratamiento. También se ensayaron como muestras control, superficies de queso sin recubrir. Todas las muestras fueron almacenadas por 21 días a temperatura ambiente. Durante el periodo de almacenamiento, se determinó mediante el hisopado cuantitativo, el número de colonias de mohos y levaduras presentes en la superficie del alimento en

contacto con las películas (salvo para el caso del área control, sin recubrir con material polimérico). La carga arrastrada por el hisopo se suspendió en buffer fosfato (pH=8) estéril y se sembró (0.2 mL) en placa. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C hasta su recuento luego de 24 hs. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

3. Resultados y discusión

3.1 Fotoinjerto de AA en películas de BOPP comercial

Las reacciones de injerto, fueron realizadas en un fotorreactor especialmente diseñado para este propósito. Luego de diferentes ensayos de optimización⁷, se determinó el siguiente listado de parámetros como las condiciones óptimas para la modificación superficial: i) 12 cm de separación entre la película de BOPP (17 cm x 27 cm) y la fuente de luz UV; ii) 0.1 M de BF y iii) Tiempo de irradiación UV < 2min.

3.2 Caracterización de las películas de BOPP injertadas con AA

La caracterización química de las superficies fue realizada por espectroscopia FT IR- ATR. En la figura 1, se puede observar el espectro correspondiente a una superficie de BOPP sin tratamiento y otro del mismo material, injertado con AA (BOPP-g-AA). Para el espectro a) correspondiente a la película de BOPP, se efectuó la siguiente asignación de bandas, típicas de dicho polímero: a) bandas a 1457 cm⁻¹ y 1376 cm⁻¹: vibraciones de flexión de CH₃; b) bandas a 2838 cm⁻¹ y 2917 cm⁻¹, vibraciones de tensión de CH₂; c) bandas a 2948 cm⁻¹ y 2867 cm⁻¹, vibraciones de tensión de CH₃. En el espectro b), correspondiente a la película de BOPP-g-AA, a diferencia del anterior, se observa una banda intensa a 1704 cm⁻¹, debida a la vibración del enlace C=O de -COOH y otra banda a 1559 cm⁻¹, correspondiente a la vibración de tensión del enlace C=O de -COO⁻. Ambas, características del poli(AA) injertado.

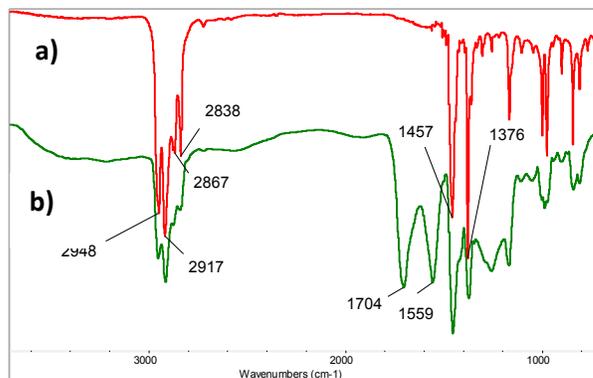


Figura 1. Espectro FT IR- ATR de: a) BOPP sin tratamiento y b) BOPP- g- AA

3.3 Inmovilización del agente antifúngico NAT

Se propuso la incorporación física del agente antifúngico NAT, a la superficie de películas plásticas de uso comercial de BOPP. Como se mencionó anteriormente, este tipo de inmovilizaciones, requiere que tanto el soporte polimérico, como la biomolécula en cuestión, cuenten con los grupos funcionales adecuados que aseguren su interacción específica. En este caso, se capitalizó la gran variedad de grupos funcionales presentes en la molécula de NAT, para conseguir su interacción con películas de BOPP injertadas con AA (BOPP-g-AA). En este proceso de inmovilización, serían tres los factores principales por los cuales se genera la unión de la NAT a la película de BOPP-g-AA: Interacción electrostática, Interacciones puente hidrogeno y Van der Waals y la Oclusión o “entrampe” del agente bioactivo debido a la morfología rugosa de las películas modificadas.

3.4 Películas bioactivas. Eficiencia antifúngica frente a *S. cerevisiae* y *A. niger*

En la Figura 2 se muestra una imagen de la cápsula de petri correspondiente al ensayo de difusión en medio de cultivo, para una película BOPP-g-AA + NAT. En ella se observa que dicha película es capaz de inhibir completamente el crecimiento de las levaduras inoculadas en la superficie del medio.



Figura 2. Ensayo de difusión en medio de cultivo para superficies de BOPPP-g-AA + NAT.

En el caso del ensayo microbiológico sobre la matriz alimenticia (queso fresco), la cantidad de microorganismos se expresó en términos logarítmicos (Log UFC). En la figura 3 se muestra el gráfico de Log UFC en función del tiempo de almacenamiento. Allí se observa que las películas BOPP-g-AA + NAT, a los 7 días de almacenamiento de la muestra a temperatura ambiente, generaron una reducción logarítmica de 1.6 unidades, con respecto a la superficie control, para el caso de levaduras. Es decir, se inhibió hasta un 97.5 % el desarrollo de las mismas en la superficie del queso. Esta capacidad de conservación de las películas activas, en comparación a la de las películas comerciales, fue sostenida prácticamente en todo el periodo de almacenamiento.

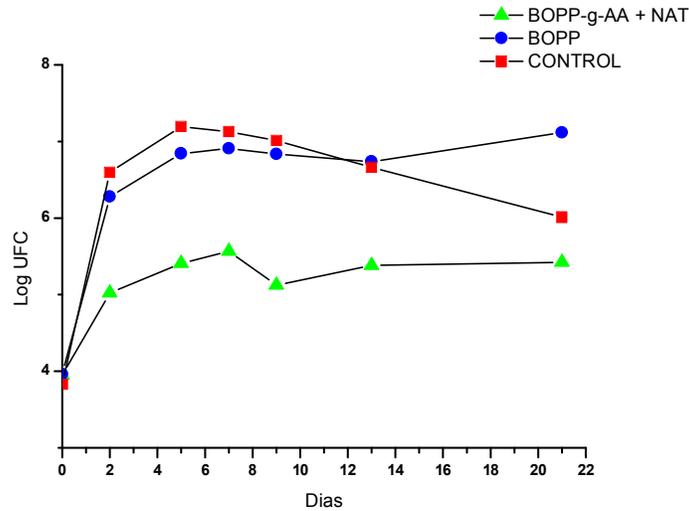


Figura 3. Log UFC de *S. cerevisiae* en función del tiempo de almacenamiento para muestras de alimento en contacto con película de BOPP, BOPP-g-AA+ NAT y muestra Control.

Para el caso del ensayo de mohos, el recuento de colonias de *A. niger* presentes en la superficie del alimento, fue obtenido de los ensayos microbiológicos realizados a los 0, 5, 15, y 21 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En la Figura 4 se presenta el valor de Log UFC para cada día de muestreo, frente a muestras blanco y control.

Se observa que a partir del día 5 de almacenamiento, en la superficie de queso fresco, en contacto con la película BOPP-g-AA + NAT, hay una reducción logarítmica de 2 unidades con respecto al control. Esto representa una inhibición del 99% de los mohos presentes en la superficie. Además, este porcentaje de inhibición, se mantuvo constante durante los 21 días de almacenamiento. Por su parte, la carga de mohos en el queso recubierto con la película comercial de BOPP, también presenta una reducción logarítmica de 2 unidades en los primeros 5 días de almacenamiento, aunque en este caso, la inhibición se ve disminuida en el transcurso de los días restantes.

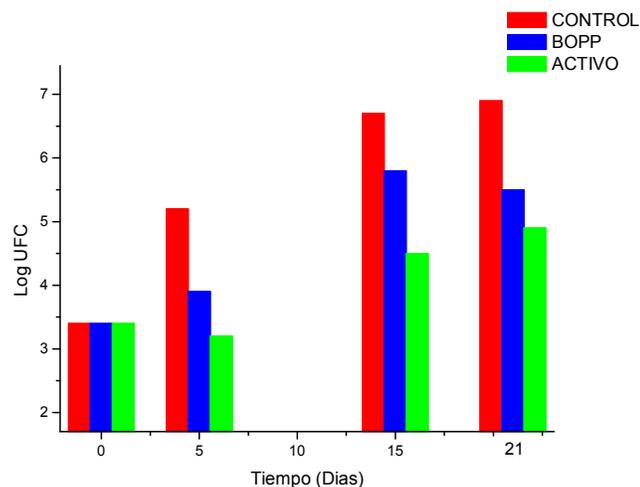


Figura 4. Log UFC en función del tiempo de almacenamiento para colonias de *A. niger* presentes en muestra de alimento en contacto con película de BOPP, BOPP-g-AA+ NAT y muestra Control.

4. Conclusiones

Se logró efectuar eficientemente el injerto de AA en superficies de BOPP comercial, mediante una técnica asistida por radiación UV. Las superficies modificadas por esta metodología sirvieron como soporte del compuesto antifúngico NAT. Dichas películas, fueron capaces de inhibir completamente el desarrollo de levaduras en la superficie del medio de cultivo. Los ensayos de inhibición sobre la matriz de queso fresco demostraron que las películas de BOPP-g-AA + NAT poseen una eficiente actividad antifúngica, reduciendo en un 96.8 % la carga de levaduras y 99% la de mohos. Este efecto inhibitorio fue sostenido en un periodo de almacenamiento de 21 días a temperatura ambiente.

La importancia del presente proyecto radica en la posibilidad de reducir la concentración de sustancias conservantes en el alimento mismo y/o incrementar su período de aptitud para el consumo. Esta innovación es muy importante por el impacto directo en la calidad de vida de los consumidores, en virtud que los mismos no ingieran sustancias químicas que no tienen una finalidad nutricional y sólo son utilizadas a los fines de extender la vida útil del alimento.

Bibliografía

Han JH. (2013). *10 Antimicrobial Packaging Systems*. First Edit. Elsevier Inc., pp.151–180. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3112-1.00010-7>.

Bilongo TG, Remigy J-C, Clifton MJ.(2010)."Modification of hollow fibers by UV surface grafting". *J. Memb. Sci.*,364(1-2),pp.304–308. Accessed March 7, 2014. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037673881000654X>.

García-Vargas M, González-Chomón C, Magariños B, Concheiro a, Alvarez-Lorenzo C, Bucio E.(2014)."Acrylic polymer-grafted polypropylene sutures for covalent immobilization or reversible adsorption of vancomycin". *Int. J. Pharm.* 461(1-2),pp.286–95. Accessed March 18, 2014.Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333904>.

Nady N, Franssen MCR, Zuilhof H, Eldin MSM, Boom R, Schroën K.(2011)."Modification methods for poly(arylsulfone) membranes: A mini-review focusing on surface modification". *Desalination*.275(1-3),pp.1–9. Accessed March 28, 2014.Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916411002268>.

Ratner BD, Hoffman AS.(2013). *Biomaterials Science. 3° Edition*. Third Edit. Elsevier. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00027-9>.

Ollé Resa CP, Jagus RJ, Gerschenson LN.(2014)."Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces". *Food Control*.35 (1),pp101–108. Accessed January 3, 2014. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003320>.

Charles G, Manzo PG, Strumia MC, Araujo S, Melo M. (2012). "Desarrollo de envases bioactivos : optimización en reacciones de fotoinjerto de ácido acrílico sobre polipropileno para la fijación de natamicina". En: *IV Congreso internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*.