

DESARROLLO DE PELÍCULAS DE CELULOSA MICROFIBRILADA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Molina, V.⁽ⁱ⁾; Blanco Massani, M.^{(i)*}; de Titto, G.^(i,ii); Corbalán, N.⁽ⁱⁱⁱ⁾; Vincent, P.⁽ⁱⁱⁱ⁾; Pomares, F.⁽ⁱⁱⁱ⁾; Eisenberg, P.^(i,ii)

(i) INTI-Plásticos. (ii) Instituto de Investigación en Ingeniería Ambiental (3iA), UNSaM. (iii) INSIBIO-CONICET. *blanco@inti.gob.ar.

OBJETIVO

La tecnología de materiales activos antimicrobianos permite extender la vida útil y/o mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos. Una potencial aplicación de películas de celulosa microfibrilada (CMF) aparece en el campo de los materiales para envases activos. Entre los agentes antimicrobianos que puede contener un material activo, los péptidos antimicrobianos constituyen una prometedora alternativa. Microcina J25(G12Y) (MccJ25(G12Y)) es un péptido que presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias enteropatógenicas. Este péptido puede ser degradado por enzimas digestivas por lo tanto no interferiría con la flora microbiana natural al ser consumido. El objetivo de este trabajo fue incorporar MccJ25(G12Y) en CMF para producir materiales con actividad antimicrobiana.

DESCRIPCIÓN

Obtención de Películas de CMF. Una suspensión de α -celulosa (Sigma C8002) al 1% (m/v) en agua destilada se procesó en un Microfluidizador M-110P (Microfluidics Corp) a 1500 bar para producir la microfibrilación de las fibras. La suspensión obtenida se dejó evaporar lentamente a 40°C para obtener películas de gramaje aprox. 80 mg/cm². Se evaluó la superficie de las películas obtenidas utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (FE-SEM) utilizando para ello un microscopio FEI Quanta 250 FEG.

Microorganismos y condiciones de cultivo. *E. coli* SBG231(pG12Y) (bacteria productora de MccJ25 (G12Y)) y *E. coli* AB1133 (sensible a microcina) fueron cultivadas a 37°C en medio de cultivo mínimo M9 (Sigma Aldrich) suplementado con MgSO₄ (1 mg/ml), vitamina B1 (1 mg/ml) y glucosa (0,2 % (m/v)). Hasta su uso, las cepas se mantuvieron a -20°C en 15% (v/v) de glicerol.

Producción y purificación de MccJ25(G12Y). El sobrenadante libre de células de un cultivo *overnight* de *E. coli* SBG231(pG12Y) fue sembrado en un cartucho preparativo C8. La columna se lavó con agua y concentraciones crecientes de metanol (20-100% (v/v)). La fracción activa (eluida con metanol al 100% (v/v)) se concentró y purificó por HPLC (columna semipreparativa de fase reversa C18,

Waters μ Bondapack 10 μ m de 300 x 19 mm) eluyendo con un gradiente de concentración lineal de acetonitrilo disuelto en agua entre el 20 y 100 % (v/v), en presencia de TFA al 0,1 % (v/v). La microcina eluida se detectó a 275 nm y su actividad antimicrobiana se evaluó frente a *E. coli* AB1133. La fracción activa colectada se liofilizó (Liofilizador Telstar Lioalea-6 (-50° C) y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Activación de la CMF. a) Determinación del tiempo mínimo de activación. Un fragmento de película de CMF (0,35 cm²) se contactó (5, 15, 30, 60 y 120 minutos a 30°C) con 0,2 ml de solución de MccJ25(G12Y) correspondiente a la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de este péptido en solución acuosa (ver (b)) [1].

b) Determinación de la CIM de MccJ25(G12Y). Diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano (6,25 10⁻³ a 8 10⁻¹ mg/ml) se contactaron con la película durante 5 minutos. Luego de los tratamientos de activación descriptos en (a) y (b), las películas se lavaron con agua destilada estéril y se determinó su actividad antimicrobiana como se detalla a continuación. Todos los ensayos de activación de la película se llevaron a cabo en dos experimentos independientes, por triplicado.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de MccJ25(G12Y) en la película de CMF. La película tratada con MccJ25(G12Y) se colocó en placas preparadas con medio M9 semisólido suplementado, inoculadas con *E. coli* AB1133 (10⁷ UFC/ml) [2]. Luego de incubar (18 h, 35 °C), la actividad antimicrobiana de las películas se puso en evidencia por la aparición de halos de inhibición que fueron medidos con el programa ImageJ 47t. (Wayne Rasband. National Institutes of Health, USA) y expresados como áreas de inhibición relativa (áreas de inhibición/área de las películas).

Análisis estadístico. Los datos experimentales fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el test de Tukey con un nivel de significancia del 95%. Se utilizó el programa Minitab Statistic release 12 (Pennsylvania, USA).

RESULTADOS

En la Figura 1a se muestra la α -celulosa antes del proceso de microfibrilación donde se observa una amplia distribución de tamaño de

partícula con la estructura de fibra conservada. La estructura microfibrilar se aprecia en la Figura 1b, donde se encuentran fibras de diámetros menores que 10 μm dispuestas de manera entrelazada debido a su alta relación de aspecto (largo/diámetro) en la película de CMF.

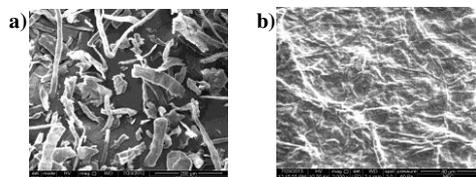


Figura 1. Micrografías SEM: a) α -celulosa; b) de una película de CMF.

En la Tabla 1 se muestran las áreas de inhibición relativas de la película de CMF luego de ser tratada con MccJ25(G12Y) ($1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) durante diferentes tiempos. No se observaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en el área de inhibición relativa de las películas para los tiempos estudiados. Estos resultados sugieren una rápida sorción de microcina en la película (a partir de 5 minutos de contacto) (Tabla 1). La sorción de péptidos para la obtención de películas activas ha sido informada para diferentes materiales. En el caso de la activación de una película de celofán con nisina se requirieron 12 horas de contacto [3], esto remarca el corto tiempo de contacto necesario para obtener una película de CMF activa. La rápida adsorción de MccJ25(G12Y) en la película de CMF indicaría un alto grado de afinidad de este péptido por la celulosa.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de la película de CMF luego del contacto (30°C) con MccJ25(G12Y) durante diferentes tiempos.

Tiempo de contacto (min)	Área de inhibición relativa (a,b)
5	2,9 (0,3) ^a
15	3,0 (0,5) ^a
30	3,5 (0,6) ^a
60	3,3 (0,5) ^a
120	3,1(0,3) ^a

(a) –Valores seguidos de letras iguales en una misma columna no presentan diferencias significativas ($P < 0,05$)
 (b) –Los datos entre paréntesis corresponden a la desviación *standard* de los replicados.

Para la obtención de películas activas antimicrobianas por sorción, es importante determinar la concentración mínima de compuesto antimicrobiano a partir de la cual ocurre la activación de la película. Como se muestra en la Figura 2, la película de CMF tratada con MccJ25(G12Y) en una concentración de $6,25 \cdot 10^{-3}$ mg/ml, no presentó actividad inhibitoria, mientras que a partir de $1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml se obtuvo una película activa, siendo esta última concentración definida como la inhibitoria mínima (CIM) para lograr la activación. La CIM encontrada para la activación de la película de CMF en nuestro

trabajo, se encuentra en el orden de la reportada para MccJ25 (G12Y) en solución acuosa [1], indicando que el proceso de activación y/o la matriz celulósica no ejercen influencias negativas en la actividad antimicrobiana del péptido. Asimismo, para las concentraciones estudiadas no se obtuvo saturación de la película con el péptido (Fig 2).

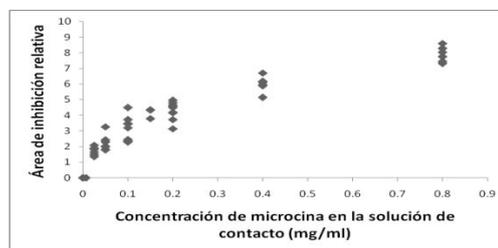


Figura 2. Actividad antimicrobiana de la película de MFC luego del contacto con distintas concentraciones de MccJ25 (G12Y).

Luego del proceso de activación, la película de CMF tratada fue lavada con agua destilada estéril a los fines de descontaminarla para evaluar su efecto inhibitorio. La película conservó su actividad antimicrobiana aún luego de dicho lavado, indicando que existirían fuertes interacciones entre el péptido antimicrobiano y la matriz de CMF.

CONCLUSIONES

Para las posibles aplicaciones tecnológicas resulta importante destacar que a partir de una concentración de solución de contacto de $1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml de MccJ25(G12Y) y un tiempo de contacto de 5 minutos, puede obtenerse una película de celulosa microfibrilada con actividad antimicrobiana. Las interacciones entre el péptido antimicrobiano y la matriz de CMF podrían deberse a la capacidad de los grupos hidroxilo de la celulosa para formar puente hidrogeno [4], y las propiedades anfífilicas de MccJ25 (G12Y) [5] que posibilitarían interacciones polares de tipo dipolo-dipolo y/o enlaces hidrógeno con la celulosa, favoreciendo la sorción y brindando estabilidad a la actividad de la película.

En conjunto, estos resultados resultan promisorios para el uso de CMF como soporte para microcina J25(G12Y) en vistas de la obtención de películas activas contra bacterias enteropatógenicas para ser usadas en la industria de alimentos.

REFERENCIAS

- Pomares, y col. (2009) *Appl environ microbiol*, **75**, 5734–5738
- Blanco Massani, y col. (2008) *Food addit contam* **25**, 1424–1430
- Guerra y col (2005) *Lett Appl Microbiol*, **40**, 106-110
- Lavoine y col. (2012) *Carbohydrate Polym* **90**, 735– 764 (2012)
- Rosengren, y col (2003) *JACS*, **125**, 12464-12474