



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PELÍCULAS ELABORADAS CON QUITOSANO A DIFERENTES PESOS MOLECULARES INCORPORANDO ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS DE ESPECIAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CHITOSAN-BASED FILMS PREPARED WITH DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS INCLUDING SPICES ESSENTIAL OILS AND FUNCTIONAL EXTRACTS AS ANTIMICROBIAL AGENTS

L. Hernández-Ochoa*, A. Gonzales-Gonzales, N. Gutiérrez-Mendez,
L.N. Muñoz-Castellanos y A. Quintero-Ramos

Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Circuito No.1 Campus Universitario,
Chihuahua, Chihuahua, México. C.P. 31125 Apartado postal 669

Recibido 1 de Junio 2011; Aceptado 26 de Septiembre 2011

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de quitosano a diferentes pesos moleculares (alto, medio y bajo peso molecular) en la elaboración de películas antimicrobianas, incorporando aceites esenciales (AE) y extractos funcionales (EF), de comino (*Cuminum cyminum* L.), clavo (*Eugenia caryophyllata*) como agentes antimicrobianos. La actividad Antimicrobiana de los AE y EF se evaluó mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) contra: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Listeria monocytogenes*. Los AE y EF seleccionados con base a los resultados microbiológicos, fueron incorporados en una matriz polimérica de quitosano a diferentes pesos moleculares, y la actividad antimicrobiana de las películas fue evaluada por la técnica de difusión en agar. Los resultados obtenidos indicaron que los AE y EF que presentaron las mejores CMIs frente a todas las bacterias fueron: comino a 750 mg/L, clavo a 500 mg/L, comino- E_7 a 750 mg/L, clavo- E_7 a 500 mg/L. Se encontró que películas plásticas de quitosano con cada uno de los diferentes pesos moleculares estudiados y los AE y EF seleccionados, requieren concentraciones mayores a 1000 mg/l de los AE y EF sobre las soluciones filmogénicas para inhibir el crecimiento bacteriano. Se determinó que las películas de quitosano a bajo peso molecular con una concentración de 2% de AE de clavo y clavo- E_7 presentan actividad antimicrobiana sobre la mayoría de las cepas probadas.

Palabras clave: películas antimicrobianas, quitosano, peso molecular, aceites esenciales.

Abstract

In this work were evaluated the effect of different molecular weight of chitosan (high, medium and low molecular weight) in the elaboration of antimicrobial films incorporating essential oils (AE) and functional extracts (EF) of cumin (*Cuminum cyminum* L.) and clove (*Eugenia caryophyllata*) as antimicrobial agents. The Antimicrobial activity of AE and EF were evaluated by determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888), *Salmonella typhimurium*, (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) and *Listeria monocytogenes*. Based on the MIC/MBC results, essentials oils and functional extracts were selected to prepare edible films based on chitosan polymeric structure. The antibacterial effect of the edible films prepared was further evaluated by zone of growth inhibition against the same foodborne pathogens. Results showed that the AE and EF with best CMIs results were: cumin (750 mg/L), clove (500 mg/L), cumin- E_7 (750 mg/L), and clove- E_7 (500 mg/L). It was determined that the films of low molecular weight chitosan with a concentration of 2% of EO of clove and clove E_7 have antimicrobial activity against most strains tested.

Keywords: antibacterial activity, chitosan, molecular weights, essentials oils.

*Autor para la correspondencia. E-mail: lhernandez@uach.mx
Tel. / Fax: + 52 614 2366000 ext. 4254

1 Introducción

La seguridad alimentaria es un tema cada vez más importante, independientemente de los avances en la salud pública y en la conservación de productos alimentarios (Longinos y col. 2005). Los últimos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos han impulsado la búsqueda de formas innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en alimentos y una opción es utilizar empaques que proporcionen un mayor margen de seguridad y calidad. Estas tecnologías podrían desempeñar un papel importante para extender la vida de anaquel de alimentos y reducir el riesgo de contaminación por la presencia de microorganismos patógenos (Appendini y Hotchkiss, 2002). Los empaques antimicrobianos son una forma de empaques activos, a los que se les añade una sustancia activa que permite mejorar la funcionalidad de estos, además, se considera que cuando se incorporan agentes antimicrobianos a un polímero, el material limita o impide el crecimiento microbiano. Los agentes antimicrobianos pueden ser compuestos sintéticos (agregados intencionadamente a los alimentos) o de origen natural (Alzamora y col. 2000). Entre las alternativas naturales se encuentran los aceites esenciales (AE), los cuales presentan principios activos químicos como hidrocarburos terpénicos, aldehídos, ácidos, alcoholes, fenoles, ésteres, cetonas, entre otros (Ortuño, 2006). Algunos AE son reconocidos por su actividad antimicrobiana, y recientemente se propone incorporarlos en los empaques para alimentos (Longinos y col. 2005). Los métodos de obtención de Aceites Esenciales más utilizados son: la hidrodestilación, que se utiliza con frecuencia para aislar y purificar aceites naturales a partir de sus fuentes biológicas (Ocampo y col. 2008), y la extracción con disolventes derivados del petróleo, sin embargo, ésta presenta el inconveniente del empleo de disolventes tóxicos, que son en muchos casos peligrosos en su manejo (Ortuño, 2006). Una alternativa actual a esta problemática, es el uso de co-solventes de origen natural en el proceso de hidrodestilación, proceso llamado co-hidrodestilación. En éste, los co-solventes son empleados para facilitar e incrementar la extracción de moléculas presentes en las fuentes biológicas. Es importante mencionar que los solventes de origen vegetal, como los ésteres etílicos de ácidos grasos, encuentran un lugar cada vez más importante, debido a sus características, como su solubilidad y a su casi total biodegradabilidad, así como su ausencia de irritabilidad y toxicidad (Hernández-Ochoa y col. 2010). Los materiales

más utilizados en los empaques para alimentos son los polímeros de origen petroquímico, debido a su gran disponibilidad, su bajo costo y características favorables de funcionalidad, como extensibilidad y fuerza de tracción. En la actualidad, se estudia a los polímeros biodegradables como materiales para elaborar este tipo de empaques (Tharanathan y Kittur, 2003). Una alternativa, es el empleo de quitosano como biopolímero para la formación de películas biodegradables, ya que la mayoría de sus propiedades mecánicas son comparables a las de muchos polímeros de películas comerciales. Además, las propiedades antimicrobianas del quitosano y sus derivados, han recibido mucha atención en los últimos años (Harish y Tharanathan, 2007). Este compuesto natural obtenido por desacetilación de la quitina, es un polisacárido catiónico formado de unidades de glucosamina con uniones β (1-4) (Hirano y Nagao, 2005, Pulido y Beristain, 2010). Se ha demostrado que el quitosano reduce el crecimiento en un amplio rango de hongos y bacterias, además, induce mecanismos de defensa, tales como las fitoalexinas y aumento en la actividad de enzimas quitinasas. Sin embargo, la funcionalidad y actividad del quitosano depende de sus características físicas, como el peso molecular y el grado de acetilación (Simpson y col. 1997, Sobral y col. 2008). El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del quitosano a diferentes pesos moleculares (alto, medio y bajo) en la elaboración de películas antimicrobianas, incorporando aceites esenciales y extractos funcionales, de comino (*Cuminum cyminum* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata*) como agentes antimicrobianos.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

La materia vegetal utilizada fue comino (*Cuminum cyminum* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata*), suministradas por Comercial Cordona de la Ciudad de Chihuahua. El quitosano a diferentes pesos moleculares: bajo (50,000-190,000 Da) medio (190,000-310,000 Da) y alto (310,000-375,000 Da) fue adquirido en Sigma-Aldrich, así como los ésteres etílicos de ácidos grasos que se utilizaron en el proceso de co-hidrodestilación como co-solventes, los cuales fueron caproato de etilo (E_6) y heptanoato de etilo (E_7). Las cepas empleadas en el estudio fueron: *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43888), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Listeria monocytogenes*, obtenidas de la colección de cultivos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

2.2 Extracción de aceites esenciales (AE) y extractos funcionales (EF)

Las especias comino y clavo se sometieron individualmente al proceso de destilación utilizando el aparato modificado de Schilcher. Se utilizaron dos métodos para la obtención de los extractos: hidrodestilación, para los aceites esenciales y co-hidrodestilación, para los extractos funcionales. En el primero de ellos, la materia vegetal fue sumergida en agua, en donde el sistema fue calentado hasta la temperatura de ebullición del agua. En el segundo método la materia vegetal se puso en contacto con agua y ésteres etílicos de ácidos grasos como cosolventes. Los ésteres que se utilizaron fueron caproato de etilo (E_6) y heptanoato de etilo (E_7), los cuales fueron seleccionados en base a estudios preliminares que mostraron su aporte a las características fisicoquímicas a las películas. El sistema también fue calentado hasta ebullición y la mezcla homogénea integrada por el aceite y el éster, se denominó extracto funcional (EF). Las condiciones de operación empleadas en la co-hidrodestilación dependieron de la materia vegetal y se basaron en lo reportado por Hernández-Ochoa y col. (2011). Para ello se utilizaron 200 g de materia vegetal, 4 L de agua y 20 mL de éster etílico en el caso de la co-hidrodestilación. En el caso de la hidrodestilación se utilizaron las mismas condiciones, sin la incorporación del éster en el proceso.

2.3 Análisis microbiológicos de los Aceites Esenciales (AE) y Extractos Funcionales (EF)

Inicialmente se realizó el análisis microbiológico de los aceites esenciales (AE) y extractos funcionales (EF) que fueron incorporados a las películas como agentes antimicrobianos, utilizando la técnica descrita por Appendini y Hotchkiss (2002). Se prepararon tubos con caldo soya tripticaseína estéril (DIFCO) y se inocularon con 1.5×10^8 UFC/mL de las diferentes cepas, para conseguir dicha concentración se suspendieron las bacterias en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7,2 hasta lograr una turbidez comparable al tubo 0.5 del

nefelómetro de McFarland. Posteriormente se agregaron concentraciones de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L de una solución concentrada de alcohol etílico absoluto (2% v/v) (99.9% Faga Lab) con los AE y EF. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se estableció observando el crecimiento (turbidez en el medio de cultivo) en los distintos tubos después de incubarlos 24 h a 37°C. La CMI fue la menor concentración que provocó una inhibición de cualquier crecimiento visible. Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó la técnica de extensión en superficie con varilla de vidrio "L" posicionando 0,1 mL de cada uno de los tubos de la prueba de CMI en los que no se detectó turbidez (pruebas negativas), en agar soya tripticaseína (DIFCO) incubando las cajas a 37 °C durante 24 h. Lo anterior para realizar el conteo de las unidades formadoras de colonias, determinando la CMB de los microorganismos. Para las pruebas de CMI y CMB se realizaron controles negativos de alcohol y ésteres etílicos de ácidos grasos utilizados como co-solventes de extracción (E_6 y E_7). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4 Elaboración de películas antimicrobianas

Las películas antimicrobianas se realizaron de acuerdo a lo publicado por Ouattara y col. (2000). Las películas se prepararon disolviendo quitosano de bajo, medio y alto peso molecular (Aldrich-Sigma) en solución acuosa (1% v/v) de ácido acético (Faga Lab). Para obtener una concentración final al 2% (p/v), se incorporó glicerina (2%) (Faga Lab) como plastificante y como agentes antimicrobianos se usaron los AE y EF seleccionados en el análisis microbiológico. Para la homogenización de todos los componentes se utilizó una mezcladora de inmersión (Bamix) a 14,000 rpm. Se vertieron 20 mL de la solución obtenida en cajas Petri de vidrio, las cuales fueron colocadas en una estufa (Fisher Scientific) a una temperatura de 60 °C durante 4 horas.

2.5 Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas elaboradas con AE y EF, se empleó la técnica de difusión en agar basada en el método de Cutter (1999). Para esta técnica se estandarizó el inóculo a una concentración aproximada de 1×10^8 UFC/mL. Se inocularon cajas con agar soya tripticaseína (DIFCO) empleando un hisopo con las

suspensiones bacterianas. Se cortaron películas de 1 cm² de cada una de las formulaciones y con unas pinzas se colocaron las películas en el centro de la superficie del agar previamente inoculado. Cada película se presionó para asegurar contacto pleno con dicha superficie, después las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se utilizaron películas control, para lo cual se examinaron películas de quitosano a los tres pesos moleculares de estudio sin adición de antimicrobianos, con el propósito de observar el efecto antimicrobiano que tenía el quitosano por sí sólo.

3 Resultados y discusión

3.1 Actividad antimicrobiana de los Aceites Esenciales (AE) y Extractos Funcionales (EF)

Con la finalidad de observar el posible efecto inhibitorio por parte del alcohol etílico, se realizaron pruebas control a distintas concentraciones (50 a 2000 mg/L) de este disolvente en lugar de los AE y EF. Los resultados del empleo de alcohol etílico demostraron que éste inhibió a todas las bacterias a concentraciones mayores de 1000 mg/L. Lo anterior se llevó a cabo para asegurar que el alcohol no tuviera interferencia sobre los resultados obtenidos en las CMI de los AE y EF de comino y clavo. En el caso de los ésteres etílicos seleccionados *E*₆ y *E*₇ como controles, se utilizaron las concentraciones de 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L, con el propósito de observar el efecto sobre las bacterias. Los resultados indicaron que el éster *E*₆ presentó actividad biológica sobre todas las bacterias estudiadas a una concentración de 50 mg/L. En el caso del éster *E*₇ se encontró que sólo es inhibitorio para *B. cereus* (ATCC 11778) a una concentración de 50 mg/L. Con base a lo anterior, se estimó que el éster *E*₆, podría tener interferencia en la actividad antimicrobiana de los EF con dicho éster y se estipuló que el éster *E*₇ no aporta ningún tipo de actividad biológica a los AE al tener CMB mayores de 1000 mg/L. En la Tabla 1 se presentan las CMI y las CMB de los AE de las plantas seleccionadas, así como de sus extractos funcionales con los diferentes ésteres empleados. Se encontró que todos los aceites esenciales y extractos funcionales tuvieron actividad biológica, sin embargo, el AE de clavo presentó mayor actividad antimicrobiana. En general los valores de CMI para todos los AE y EF oscilaron entre 100 y 750 mg/L. Se observó que las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles,

particularmente *B. cereus* (ATCC 11778) el cual fue susceptible a concentraciones bajas de los AE y EF, esto concuerda con los resultados obtenidos por Nychas (1995) que indica que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas a los compuestos antimicrobianos de AE de especias, como los compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas y terpenos. En términos generales, la diferencia consiste en que la pared celular de las bacterias Gram negativas es más delgada que la de las Gram positivas, y las Gram negativas contiene una membrana externa con un alto porcentaje de lípidos (García y col., 2004). La presencia de esta segunda membrana protege a la pared celular (Benson, 1997), considerando que la pared celular es esencial para mantener la integridad de la célula (García, 2005). Los resultados obtenidos mostraron también, el potencial antimicrobiano del AE de clavo, el cual presentó valores de inhibición de 500 mg/L frente a todas las bacterias evaluadas. En general, los extractos funcionales de clavo exhibieron valores muy similares a los determinados con el aceite esencial, a excepción de clavo-*E*₆ contra *L. monocytogenes*, ya que esta bacteria mostró mayor resistencia a una concentración de 750 mg/L. La actividad antimicrobiana mostrada por el AE de clavo, puede ser atribuible a la presencia de Eugenol, debido a que este compuesto fenólico es responsable del daño en la envoltura celular bacteriana (Rhayour y col. 2003). Otros compuestos minoritarios presentes en el aceite esencial también poseen propiedades antimicrobianas, como el caso del cariofileno (Ayoola y col. 2008). Dorman y Deans (2000) afirman que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se relaciona con la composición química de los mismos, con la configuración estructural de los compuestos que los constituyen, con sus grupos funcionales y con las posibles interacciones sinérgicas entre los compuestos. En el caso del AE de comino, se observó que *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) y *S. typhimurium* (ATCC 14028) tuvieron valores de 750mg/L de CMI. En cuanto a los extractos funcionales de comino, se encontró que comino-*E*₆ exhibió inhibición a concentraciones similares a las analizadas para el aceite esencial para el caso de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) y *S. typhimurium* (ATCC 14028), sin embargo, se percibió un aumento del doble en la concentración para las bacterias *L. monocytogenes* y *B. cereus* (ATCC 11778). Iacobellis y col. (2005) atribuyen la actividad antimicrobiana del aceite esencial de comino al alto nivel de cuminaldehído, así como a otros compuestos minoritarios presentes como β -pineno, limoneno y α -pineno.

Tabla 1. CMI y CMBs de los aceites esenciales (AEs) y extractos funcionales (EXs) de comino y clavo para cada una de las bacterias patógenas estudiadas.

AEs/Exs	Bacterias									
	<i>E. Coli</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. Aureus</i>		<i>B. Cereus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Comino	750	750	750	750	250	750	500	750	100	500
Comino-E ₆	750	750	750	750	500	750	750	750	750	500
Comino-E ₇	750	750	750	750	750	>1000	250	750	250	250
Clavo	500	500	500	750	500	1000	500	750	500	500
Clavo-E ₆	500	750	500	750	750	1000	500	750	500	500
Clavo-E ₇	500	500	500	500	500	>1000	500	500	250	250

^aLas CMIS y las CMBs están expresadas en mg/L. Se realizaron tres repeticiones por concentración para la determinación de la CMB.

3.2 Elaboración de películas antimicrobianas

Con base a los resultados obtenidos en la determinación de la CMI y la CMB se seleccionaron los AE y EF que presentaron mayor actividad antimicrobiana contra las bacterias estudiadas. Así mismo, se seleccionaron las CMI dentro de las cuales existió un efecto bacteriostático. Los aceites esenciales y extractos funcionales que mayor actividad biológica presentaron fueron: comino a 750 mg/L, clavo a 500 mg/L, comino-E₇ a 750 mg/L, clavo-E₇ a 500 mg/L. En la Fig. 1 se muestran las diferentes características observadas en las películas elaboradas dependiendo del peso molecular que fue utilizado. Se observó que las películas elaboradas con quitosano de bajo peso molecular eran color amarillo/ámbar, fáciles de desprender, homogéneas y sin olor característico de los antimicrobianos incorporados. Así mismo, se pudo observar que las películas de medio peso molecular fueron quebradizas, a excepción de las elaboradas adicionando aceite esencial de clavo y comino. Sin embargo fueron las películas de alto peso molecular, las que presentaron mayor resistencia al quiebre. La mayoría de las películas elaboradas con medio peso molecular fueron color amarillo/ámbar excepto las adicionadas con aceite esencial de clavo. En el caso de las elaboradas con alto peso molecular se encontraron tres escalas de color diferente: amarillo/ámbar para AE de comino y EF de comino E₇, blanco con AE de clavo y EF clavo E₇ y por último, transparente utilizando quitosano control. Las películas que presentaron mayor facilidad de desprendimiento, a alto peso molecular son en las que se adicionó AE de clavo, sin embargo, éstas también conservaron un fuerte olor del aceite esencial. Otras que presentaron estas mismas características fueron aquellas que contenían AE de clavo, comino y EF de comino con éster E₇. A un alto peso molecular se observó, que

todas las películas fueron homogéneas, excepto las elaboradas con quitosano solo sin la incorporación de agentes antimicrobianos, las que presentaron mayor facilidad al desprendimiento fueron las que contenían aceite esencial de clavo y el extracto funcional clavo E₇.

3.3 Actividad antimicrobiana de las películas

Se evaluaron secciones de las películas elaboradas con quitosano a los diferentes pesos moleculares incorporando los aceites esenciales y extractos funcionales (a las concentraciones establecidas). Se apreció inicialmente que en la parte donde fueron colocadas las películas, no existió crecimiento bacteriano, sin embargo, lo anterior no se consideró como un efecto inhibitorio de las películas, debido a que probablemente lo que ocurrió fue sólo un impedimento físico que no permitió el crecimiento. Una excepción fue el caso de *L. monocytogenes*, en donde se observó crecimiento sobre algunas de las películas. Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de cada una de las películas evaluadas considerando los halos de inhibición generados, mostraron que las películas de quitosano a los tres pesos moleculares estudiados, sin adición de antimicrobianos (control) no exhibieron zonas de inhibición contra las cepas probadas, solo se percibió inhibición en la parte donde fueron colocadas las películas. Hosseini y col. (2008) mencionan que independientemente de la actividad antimicrobiana de este biopolímero debido a sus características naturales, el efecto antimicrobiano del quitosano ocurre sin la migración de agentes activos y que el quitosano no se difunde a través del agar, por lo tanto, sólo inhibe microorganismos en contacto directo con los sitios


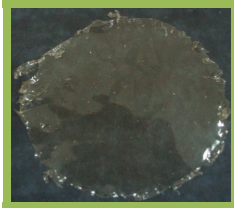
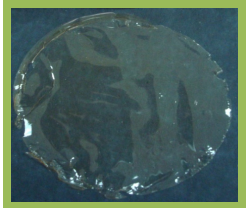

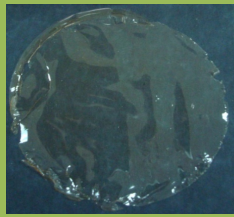
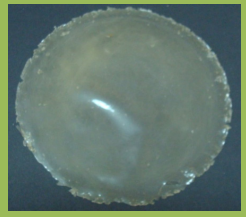

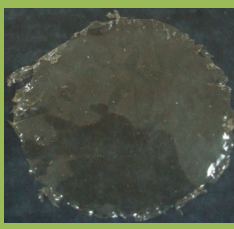



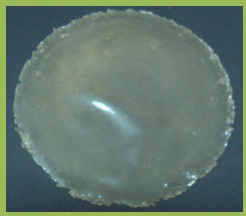


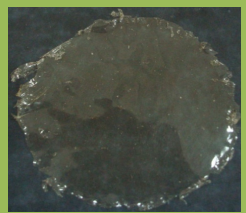
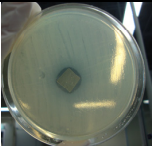
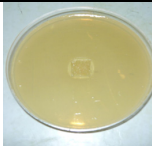
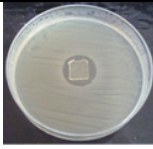
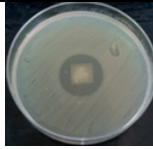
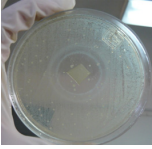
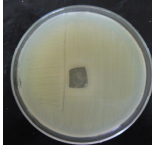
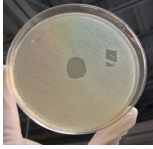
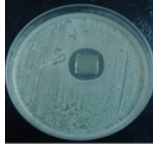
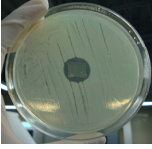
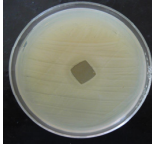
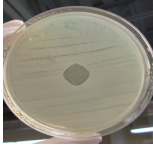
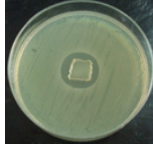
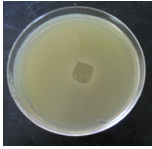
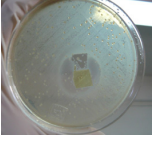
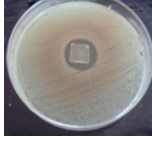
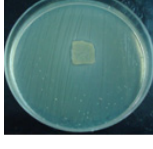
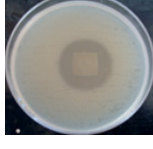
Película	Bajo PM	Medio PM	Alto PM
Control			
Aceite Esencial Clavo			
Aceite Esencial Comino			
Extracto Funcional Clavo C ₇			
Extracto Funcional Comino C ₇			

Fig. 1. Imágenes de las películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares y adicionando agentes antimicrobianos.

activos del quitosano. Con respecto a las películas elaboradas con quitosano a los diferentes pesos moleculares estudiados e incorporando los aceites esenciales como agentes antimicrobianos, se observó que en el caso de las películas de quitosano y aceite esencial de comino sólo existió inhibición en las películas elaboradas con quitosano de medio

peso molecular contra la cepa de *B. cereus* (ATCC 11778), determinándose por lo tanto, que las películas elaboradas con este aceite esencial y su extracto funcional no mostraron actividad antimicrobiana. Resultados diferentes se encontraron con las películas elaboradas con el aceite esencial de clavo y su extracto funcional, como se observa en la Fig. 2.

Bacteria	Bajo peso molecular		Medio peso molecular		Alto peso molecular	
	AE Clavo	EXs Clavo	AE Clavo	EXs Clavo	AE Clavo	EXs Clavo
<i>E.coli</i>				ND		ND
<i>S. Aureus</i>				ND		ND
<i>S. Typhimurium</i>				ND		ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND		ND	ND	ND	ND
<i>B. cereus</i>				ND		ND

ND: No se determinó inhibición.

Fig. 2. Imagen de los halos de inhibición generados por las películas elaboradas con quitosano a los diferentes pesos moleculares y Aceite esencial (AEs) y Extracto funcional (EXs) de Clavo.

En ésta, se pueden observar los mayores diámetros de halos de inhibición del estudio realizado, los cuales fueron obtenidos con quitosano a bajo peso molecular. Se observa actividad antimicrobiana en menor proporción en las películas elaboradas con quitosano a medio y alto peso molecular cuando se adicionó el aceite esencial de clavo. Estos resultados concuerdan con los resultados anteriores obtenidos en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas bactericidas (CMB), en las cuales se observó que la mayor actividad antimicrobiana fue obtenida con el aceite esencial de clavo y el extracto funcional del mismo (a 500 mg/L y 750 mg/L respectivamente). Esto puede suponer inicialmente una buena compatibilidad entre el aceite esencial de clavo y el quitosano a bajo peso molecular. Trabajos realizados por algunos autores (Shafiur, 2007, Alves y col., 2006, Zivanovic y Draughon, 2005, Simpson y col., 1997) describen haber obtenido resultados

diferentes al evaluar el efecto antimicrobiano de quitosano, a diferente peso molecular sobre algunas bacterias, por ejemplo, Liu y col. (2006) trabajaron con siete diferentes pesos moleculares de quitosano, entre 5000 Da y 9.16×10^4 Da sobre *E. coli*, los resultados mostraron que se tenía mejor efecto antimicrobiano a mayores pesos moleculares. Una contradicción a esto, surgió cuando estos mismos autores trabajaron con quitosano a pesos moleculares entre 9.16×10^4 Da y 1.08×10^6 Da, observando, que el efecto sobre *E. coli* disminuyó gradualmente al aumentar el peso molecular. Lo anterior podría explicarse, por la dificultad del quitosano de alto peso molecular para difundirse a través de la estructura celular de los microorganismos evaluados, debido a su alta viscosidad. También podría atribuirse a que los agregados que se forman en las interacciones entre el quitosano y la pared celular, reducen los sitios disponibles de las moléculas de quitosano

y por lo tanto su eficiencia antimicrobiana (Lim y Hudson, 2003). Esto puede ayudar a explicar el comportamiento de las películas antimicrobianas obtenidas en este estudio con quitosano a los diferentes pesos moleculares, en las cuales, se encuentra mayor actividad en las elaboradas con quitosano a alto peso molecular, sin embargo, es importante considerar que la incorporación del aceite esencial y extractos funcionales en su elaboración implicaría un reacomodo estructural, influenciando las propiedades antimicrobianas de las películas.

Conclusiones

Con los resultados anteriores se puede concluir que las películas elaboradas con quitosano a los tres pesos moleculares evaluados en este estudio incorporando aceite esencial y extracto funcional de clavo como agente antimicrobiano, fueron las que presentaron actividad biológica contra las bacterias estudiadas, sin embargo, fue a alto peso molecular que se encontraron los mayores valores de los halos de inhibición, esto puede sugerir una compatibilidad entre el quitosano de alto peso molecular, el aceite esencial y extracto funcional de clavo en la elaboración de películas antimicrobianas, las cuales pueden ser consideradas potencialmente para ser utilizadas como material de empaque activo, y para la prevención y control de microorganismos patógenos en alimentos.

Referencias

- Alves, V., Costa, N., Hilliou, L., Larotonda, F., Gonçalves, M., Sereno, A. y Coelho, I. (2006). Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination* 199, 331-333.
- Alzamora, S.M., Tapia, M.S. y López-Malo, A. (2000). *Natural antimicrobials from plants, minimally processed fruits and vegetables: fundamental aspects and applications*. Springer. E.U.A.
- Appendini, P. y Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3, 113-126.
- Ayoola, G.A., Lawore, F.M., Adelowotan, T., Aibinu, I.E., Adenipekun E., Coker H.A.B. y Odugbemi, T. O. (2008). Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *African Journal of Microbiology Research* 2, 162-166.
- Benson S.A. (1997). *Ultrastructure of bacteria, Principles of medical biology: microbiology*. Elsevier Applied Science Publisher. London, England.
- Cutter, C. (1999). The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *Journal of Food Protection* 62, 474-479.
- Dorman, H.J. y Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- García, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers* 56, 339-345.
- García, V. (2005). *Estructuras bacterianas y su función, Introducción a la microbiología*. Editorial EUNED. San José, Costa Rica.
- Hirano, S. y Nagao, N., (2005). Effect of chitosan, pectic acid, lysosyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 3065-3066.
- Harish, K.V. y Tharanathan R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in Food Science & Technology* 18, 117-131.
- Hernández-Ochoa, L. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine solvant/actif d'origine végétale. *Institut National Polytechnique de Toulouse*. Toulouse (France) 3, 101-116.
- Hernández-Ochoa, L., Mouloungui, Z. y Sandoval-Salas, F. (2010). Utilization of semi continuous catalytic reactive distillation process in the esterification of heptanoic acid. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 323-328.
- Hernández-Ochoa, L., Macias-Castañeda C.A., Nevarez-Moorillon, G.V., Salas-Muñoz E. y Sandoval-Salas F. (2011). Antimicrobial Activity of chitosan-based films including spices essential oils and functional extracts. *Journal of Food* 10, 23-37.

- Hosseini, M.H., Razavi, S.H, Mousavi., Yasaghi, S.A.S. y Hasansaraei, A.G. (2008). Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 8, 2895-2900.
- Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F. y Senatore, F. (2005). Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum L.* and *Carum carvi L.* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 57-61.
- Lim S.H. y Hudson S.M. (2003). Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *Journal of Macromolecular Science* 43, 223-269.
- Liu N., Chen X., Park H., Liu Ch., Meng X. y Yu L. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers* 64, 60-65.
- Longinos, S., Mendoza, M. y Quezada, J. (2005). Películas antimicrobianas para carne y productos cárnicos. *Mundo Lácteo y Cárnico* 5, 12-17.
- Nychas, G.J.E. (1995). *Natural antimicrobial from plants, New methods of food preservation*. Springer, New York, E.U.A.
- Ocampo, R., Ríos, L.A., Betancur, L.A. y Ocampo, D.M. (2008). *Extracción de productos naturales. Curso práctico de química orgánica: enfocado a biología y alimentos*. Editorial Universidad de Caldas, Colombia, Colombia.
- Ortuño, M.F. (2006). *Métodos de obtención de aceites esenciales. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Ed. Aiyana Ediciones. Murcia, España.
- Ouattara, B., Simard, R., Piette, G., Bégin, A. y Holley, R. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal Food Microbiology* 62, 139-148.
- Pulido A. y Beristain, C.I. (2010). Spray dried encapsulation of ascorbic acid using chitosan as wall material. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9, 189-195.
- Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K. y Remmal, A. (2003). The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research* 15, 356-362.
- Shafiur, R.M. (2007). *Packaging as a preservation technique, In Handbook of food preservation*. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. N.Y., E.U.A.
- Simpson, B.K., Gagnè N., Ashie, I.N.A. y Noroozi E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology* 11, 25-44.
- Sobral, P., Alvarado, J., Zaritzky, N.E, Laurindo, J.B., Gómez- Guillén, C., Añón, M.C., Montero, P., Denavi, G., Molina, Ortiz, S., Mauri, A., Pinotti, A., García, M., Martino, M.N. y Carvalho, R. (2008). *Films base on biopolymer from conventional and non-conventional sources, Food engineering integrated approaches*. Springer Science, New York. N.Y. USA.
- Tharanathan, R.N. y Kittur, F.S. (2003). Chitin, the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 61-87.
- Zivanovic, S., Chi, S. y Draughon, A. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Food Microbiology and Safety* 70, 45-51.