

Desarrollo de films poliméricos biobasados con Eugenol y Acetileugenol: Inhibición del Crecimiento Bacteriano

Development of Bio-based Polymeric Films with Eugenol and Acetylenol: Inhibition of Bacterial Growth

Presentación: 21/08/2024

Rocío Boriglio

Ingeniería de Procesos Sustentables, UTN Facultad Regional San Francisco (2400), San Francisco, Argentina.
rocioboriglio@gmail.com

Brisa Córdoba Boschetti

Ingeniería de Procesos Sustentables, UTN Facultad Regional San Francisco (2400), San Francisco, Argentina.
brisaboschetti91@gmail.com

Luisina Bressán

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - INTEC (UNL-CONICET) (3000), Santa Fe, Argentina.
luisinabressan@gmail.com

María Eugenia Taverna

Ingeniería de Procesos Sustentables, UTN Facultad Regional San Francisco (2400), San Francisco, Argentina.
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - INTEC (UNL-CONICET) (3000), Santa Fe, Argentina.
metaverna@santafe-conicet.gov.ar

Carlos Busatto

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - INTEC (UNL-CONICET) (3000), Santa Fe, Argentina.
cbusatto@santafe-conicet.gov.ar

Paula C. Garnero

Ingeniería de Procesos Sustentables, UTN Facultad Regional San Francisco (2400), San Francisco, Argentina.
pgarnero@facultad.sanfrancisco.utn.edu.ar

Resumen

El creciente interés por alimentos frescos sin conservantes sintéticos ha impulsado el desarrollo de envases activos para mejorar su conservación. El uso de antimicrobianos naturales, como el eugenol, es una alternativa prometedora debido a sus propiedades antisépticas y antibacterianas, aunque su volatilidad y sensibilidad al oxígeno y la luz limitan su aplicación. El acetileugenol, un derivado del eugenol, también ha demostrado actividad antimicrobiana. Incorporar estos compuestos en matrices poliméricas biobasadas es una solución eficaz para crear envases activos que prolongan la vida útil de los alimentos sin recurrir a conservantes sintéticos. El objetivo de este trabajo es la síntesis del acetileugenol, y el desarrollo de films de alginato y quitosano conteniendo eugenol y acetileugenol como agentes inhibitorios de bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados muestran que es posible obtener films biobasados con excelentes propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano.

Palabras clave: eugenol; acetileugenol; films poliméricos biobasados; inhibición microbiana.

Abstract

The growing interest in fresh food without synthetic preservatives has prompted the development of active packaging to improve preservation. The use of natural antimicrobials, such as eugenol, is a promising alternative due to its antiseptic and antibacterial properties, although its volatility and sensitivity to oxygen and light limit its application. Acetyeugenol, a derivative of eugenol, has also demonstrated antimicrobial activity. Incorporating these compounds into bio-based polymeric matrices is an effective solution to create active packaging that prolongs the shelf life of food without resorting to synthetic preservatives. The aim of this work is the synthesis of acetyeugenol, and the development of alginate and chitosan films containing eugenol and acetyeugenol as inhibitory agents against bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results show that it is possible to obtain bio-based films with excellent bacterial growth inhibitory properties.

Keywords: eugenol; acetyeugenol; bio-based polymeric films; microbial inhibition.

Introducción

En los últimos años ha aumentado el interés de los consumidores por alimentos frescos o mínimamente procesados, sin conservantes sintéticos, con una vida útil prolongada y una calidad controlada. El desarrollo de envases activos se presenta como una tecnología prometedora para mejorar la conservación de los alimentos con el objetivo de cumplir con estos requisitos (Wicochea-Rodríguez *et al.*, 2019).

Debido a los posibles problemas de salud relacionados con los conservantes sintéticos, el uso de antimicrobianos de origen natural se está convirtiendo en una alternativa atractiva entre los aditivos que se pueden incorporar en la matriz del envase.

En ese sentido, el eugenol (4-alil-2-metoxifenol) es un compuesto fenólico presente principalmente en los aceites esenciales que se obtienen a partir del clavo de olor, la canela y la nuez moscada. Es un líquido aceitoso de color amarillo pálido que posee un olor característico y además es poco soluble en agua (Taverna *et al.*, 2022).

Debido a sus propiedades antisépticas y antibacterianas ha sido ampliamente investigado para diversas aplicaciones en el área de la odontología, la industria de los alimentos y la medicina. Sin embargo, su alta volatilidad y su sensibilidad al oxígeno y a la luz limitan su uso en la industria alimentaria (Cheng *et al.*, 2019).

Por otra parte, el acetileugenol, es un compuesto orgánico derivado del eugenol, se trata de un éster acetilado del eugenol. A su vez, fue evidenciado que tiene actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias y hongos, además de sus usos en las industrias alimentarias y de productos cosméticos y/o farmacéuticos (de Almeida *et al.*, 2019).

La incorporación de eugenol y sus derivados en matrices poliméricas se ha propuesto como una alternativa eficaz para producir envases activos para alimentos (Taverna *et al.*, 2022). Se han reportado trabajos sobre matrices poliméricas que contienen eugenol destinadas a envases alimenticios tales como films de almidón (Cheng *et al.*, 2019; Talón *et al.*, 2019), polietileno lineal de baja densidad (Goñi *et al.*, 2016), poli-3- hidroxibutirato (Melendez-Rodríguez *et al.*, 2019), quitosano y alginato de sodio (Purwanti *et al.*, 2018).

Es importante mencionar que los films basados en polímeros naturales (polisacáridos, proteínas) son preferibles a los derivados del petróleo. En este sentido, el quitosano y el alginato de sodio son excelentes candidatos para la obtención de films para ser utilizados en la industria de los envases de alimentos. El quitosano es un polisacárido compuesto de unidades de glucosamina y N-acetil-glucosamina distribuidas al azar. La obtención de quitosano a partir de la quitina se realiza a través de un proceso de desacetilación parcial alcalina de residuos de la industria pesquera de crustáceos. Las costas de la República Argentina son una de las principales fuentes de crustáceos de excelente calidad en el mundo (Caprile, 2005). Por otra parte, el alginato de sodio es un polisacárido natural extraído de las paredes celulares de algas pardas con estructura similar a los hidrogeles solubles en agua. Es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica, biomédica y en biotecnología. Ha sido muy atractivo para la industria de los alimentos debido a sus características espesantes, estabilizantes y gelificantes (Muchiutti *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se sintetizó y caracterizó acetileugenol y se desarrollaron films de alginato y quitosano, a los cuales se les incorporaron eugenol y acetileugenol como agentes inhibitorios de bacterias tales como la *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Se realizaron antibiogramas para ambas cepas de bacterias y se compararon resultados con los reportados en la bibliografía.

Desarrollo

a) Materiales utilizados

Para el desarrollo de los films se utilizó alginato de sodio (Pura Química S. A.), quitosano (Sigma-Aldrich) y cloruro de calcio (Cicarelli).

Para la síntesis del acetileugenol se emplearon los siguientes reactivos: eugenol (Sigma-Aldrich); piridina (Sigma-Aldrich); diclorometano (Sintorgan); DMAP (4-(dimetilamino)-piridina) (Sigma-Aldrich); anhídrido acético (Cicarelli); bisulfato de potasio (Sigma-Aldrich).

b) Síntesis y caracterización del acetileugenol

Para la síntesis de acetileugenol, se partió de una solución preparada mediante la agitación de 10,00 g de eugenol en 2,00 ml de piridina, a la cual se le incorporaron 20,00 ml de diclorometano y 10,00 mg de DMAP. La solución se mantuvo en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió anhídrido acético en una relación molar de 1:1 con respecto al eugenol, y se continuó la agitación durante 60 minutos más. Una vez finalizada la reacción, se incorporó una solución al 10,00% de bisulfato de potasio (KHSO_4) para neutralizar el exceso de piridina. A continuación, se realizó una extracción con 20,00-30,00 ml de diclorometano (DCM) para eliminar las impurezas solubles en agua. Cada vez que se añadía DCM, la mezcla se agitaba vigorosamente y se dejaba reposar para permitir la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa, que contenía las sales disueltas, se drenó, conservándose la fase orgánica.

Posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua hasta alcanzar un pH neutro (pH 7) y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar cualquier traza de agua en la mezcla. Finalmente, el solvente se evaporó al vacío utilizando un rotavapor, separando así el acetileugenol. El acetileugenol se caracterizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN). Los espectros se adquirieron en un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker UltraShield™ 400 (Bruker, Alemania) a 400 MHz, empleando cloroformo deuterado como disolvente para las muestras secas. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm, y para el análisis de los espectros se utilizó el software Mestre-C. La asignación de los picos se hizo a partir de las señales características del eugenol y el acetileugenol reportadas por Altamirano *et al.* (2005).

c) Preparación de films

Para la preparación de los films, inicialmente se preparó una solución de alginato de sodio al 2,00% en peso en agua destilada, calentándola a 60 °C hasta lograr su completa disolución. Además, se obtuvieron películas de alginato reticulado iónicamente mediante tratamiento con cloruro de calcio (CaCl_2) al 20,00%. Paralelamente, se prepararon films de quitosano al 1,00% (p/v). Las composiciones detalladas de los films se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los films de alginato de sodio y quitosano.

Films	Eugenol (g)	Acetileugenol (g)	Alginato de sodio 2,00% (g)	Quitosano (g)	Ácido acético glacial (g)	Cloruro de calcio (20,00%) (g)
1	1	-	1	-	-	0,1
2	1	-	1	-	-	-
3	-	1	1	-	-	0,1
4	-	1	1	-	-	-
5	1	-	-	1	1	-
6	-	1	-	1	1	-

Una vez preparadas las soluciones, se vertieron en moldes y se secaron en una estufa de vacío a 60 °C durante 48 horas. Posteriormente, los films se desmoldaron y se almacenaron en un desecador hasta su análisis.

d) Ensayos microbiológicos

Para la realización de los ensayos de antibiogramas se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Luego de preparar los films (según las proporciones indicadas en la Tabla 1), se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la hora del ensayo. La actividad antimicrobiana de los films frente a *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se evaluó mediante el método de difusión en agar midiendo el diámetro de la zona de inhibición producida por el film (Malbrán, 2012). Se dispusieron discos de

cada uno de los films en cajas de Petri, conteniendo como medio de cultivo Tripteína de soya agarizada. Una de ellas fue previamente inoculada con *Escherichia coli* ATCC 8739 y la otra, con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Se preparó el inóculo siguiendo el método de suspensión directa de colonias en una solución salina para obtener una densidad de 0,50 en escala de McFarland que equivale a una concentración de $1,50 \times 10^8$ UFC/mL (McFarland, 1907) y se redujo la concentración de bacterias a 10^6 UFC/mL para su posterior realización del ensayo.

Mediante un hisopo embebido en la solución se distribuyó de manera uniforme en toda la placa y se colocó en la superficie cada uno de los films a ensayar. A continuación, las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente se analizaron los resultados de cada film para cada bacteria, en los casos donde hubo inhibición, se midió el halo generado con el software Image J.

e) Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestra el espectro correspondiente al acetileugenol sintetizado. Se puede observar una pureza de alrededor del 60,00% de acetileugenol, y un espectro “limpio” de la reacción llevada adelante.

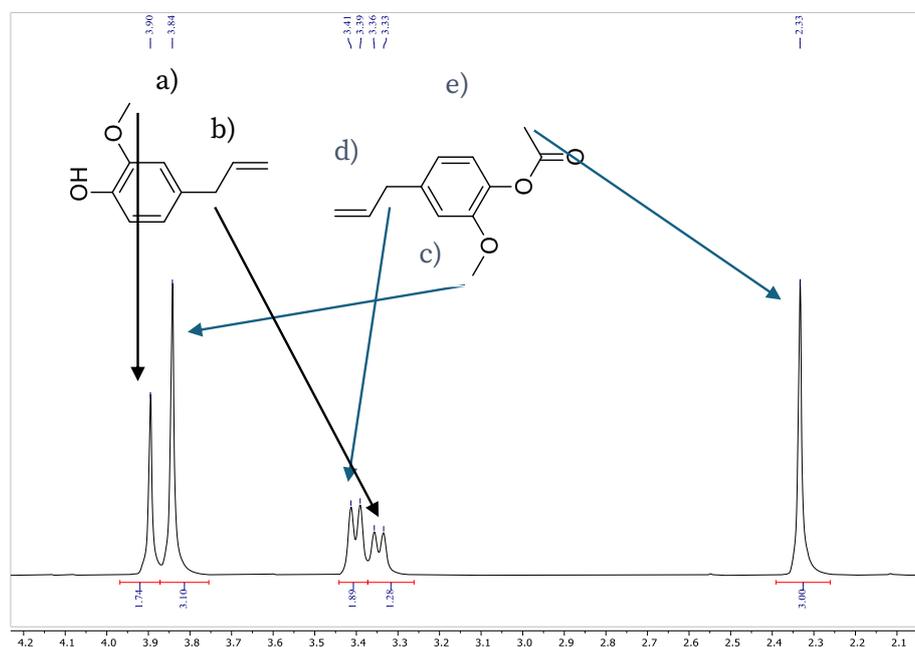
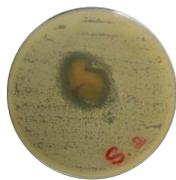


Figura 1. ^1H RMN espectro del acetileugenol.

Para el eugenol, el protón metílico muestra un desplazamiento químico de 3,90 ppm (a), mientras que los H adyacentes al doble enlace se observan a 3,35 ppm (b). Por otra parte, la señal con desplazamiento químico en 3,82 ppm corresponde al H metílico del acetileugenol (c) y la señal en 3,38 ppm corresponde a los H adyacentes al doble enlace en el acetileugenol (d). Asimismo, se puede observar en 2,31 ppm la señal correspondiente al H del grupo carbonilo presente en el acetileugenol (e).

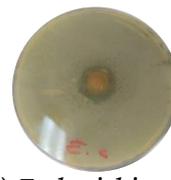
La Fig. 2 muestra los halos de inhibición de un film de alginato sin reticulado para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como bacterias representativas Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente.

a)



a) *Staphylococcus aureus*.

b)



b) *Escherichia coli*.

Figura 2. Ejemplo de ensayo de difusión en agar para film de alginato sin reticulado conteniendo eugenol utilizando los dos microorganismos.

En la tabla 2 se presentan los halos de inhibición de los diferentes films preparados.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de los films mediante la técnica de difusión en agar *

Films	Microorganismo	
	Diámetros de halos de inhibición (mm)	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
1	No inhibe	No inhibe
2	19,5	27
3	No inhibe	20
4	No inhibe	25
5	No inhibe	No inhibe
6	17	19,5

*El diámetro medido comprende los 5 mm del film.

Los resultados obtenidos revelan que la capacidad antimicrobiana de los films varía significativamente según la presencia de CaCl_2 y el tipo de compuesto incorporado, estos resultados son consistentes con los presentados por Ghosal *et al.* (2019). Los films de alginato sin entrecruzamiento, tanto con eugenol (2) como con acetileugenol (4), mostraron una considerable actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición de 27,00 mm y 25,00 mm respectivamente, mientras que el film con eugenol también inhibió *Escherichia coli* con un halo de 19,50 mm. En contraste, los films reticulados (1 y 3) no inhibieron *E. coli* y apenas mostraron actividad frente a *S. aureus*, sugiriendo que el reticulado restringe la difusión de los compuestos antimicrobianos, limitando su eficacia. La mayor susceptibilidad de *S. aureus*, una bacteria Gram-positiva, frente a los compuestos probados en comparación con *E. coli*, Gram-negativa, resalta la importancia de las diferencias en la estructura de la pared celular bacteriana en la difusión y acción de los agentes antimicrobianos. En los films de quitosano, se observó que el film con acetileugenol (6) presentó actividad antimicrobiana contra ambas bacterias, con halos de 17,00 mm para *E. coli* y 19,50 mm para *S. aureus*, mientras que el film con eugenol (5) no mostró inhibición alguna. Esto sugiere que el acetileugenol se difunde mejor a través de la matriz de quitosano que el eugenol, lo que podría deberse a diferencias en la interacción del compuesto con la matriz polimérica o en su solubilidad. En general, estos resultados subrayan la importancia del diseño del film y la naturaleza del compuesto activo en la eficacia antimicrobiana, destacando que la difusión del agente antimicrobiano dentro del material es un factor crítico para su actividad. Los resultados obtenidos están en concordancia con lo reportado por Taverna *et al.*, 2022.

Conclusiones

Se han desarrollado films poliméricos de alginato de sodio y quitosano conteniendo eugenol y acetileugenol. Los mismos presentan excelentes propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano demostrando que son una alternativa prometedora para la obtención de films biobasados para ser utilizados como envases activos en la industria de los alimentos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) por el apoyo financiero a través del PID 2023 PAECSF0010103. Agradecemos al Dr. Javier Guastavino de INTEC (UNL-CONICET) por su colaboración en las determinaciones de ^1H RMN.

Referencias

- Altamirano, H. C., Cardona, W., Espinoza, L., & Gallardo, C. (2005). "Síntesis de probables antioxidantes naturales derivados de eugenol. Revista Cubana de Química", 17(3), 209-214.
- Caprile, M. D. (2005). "Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. International Solid Waste Association. Hacia un sistema integral de gestión de residuos sólidos urbanos. Copenhagen", ISWA, 1-6.
- Cheng, J., Wang, H., Kang, S., Xia, L., Jiang, S., Chen, M., & Jiang, S. (2019). "An active packaging film

- based on yam starch with eugenol and its application for pork preservation". *Food Hydrocolloids*, 96, 546-554.
- de Almeida, A. L., Caleffi-Ferracioli, K. R., de L Scodro, R. B., Baldin, V. P., Montaholi, D. C., Spricigo, L. F., ... & Cardoso, R. F. (2019). "Eugenol and derivatives activity against Mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria and other bacteria". *Future Microbiology*, 14(4), 331-344.
- Ghosal, K., Das, A., Das, S. K., Mahmood, S., Ramadan, M. A. M., & Thomas, S. (2019). "Synthesis and characterization of interpenetrating polymeric networks based bio-composite alginate film: a well-designed drug delivery platform". *International journal of biological macromolecules*, 130, 645-654.
- Goñi, M. L., Gañán, N. A., Strumia, M. C., & Martini, R. E. (2016). "Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation". *The journal of supercritical fluids*, 111, 28-35.
- Malbran, C. (2012). "Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución". *MIC testing*, 32(2), 1-48.
- McFarland, J. (1907). "The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines". *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176-1178.
- Melendez-Rodriguez, B., Figueroa-Lopez, K. J., Bernardos, A., Martínez-Máñez, R., Cabedo, L., Torres-Giner, S., & M. Lagaron, J. (2019). "Electrospun antimicrobial films of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing eugenol essential oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles". *Nanomaterials*, 9(2), 227.
- Muchiutti, G. S., López Novello, L. H., Córscico, F. A., & Larrosa, V. J. (2019). "Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes en el aceite esencial de orégano". *Ciencia, docencia y tecnología*, (59), 297-309.
- Purwanti, N., Zehn, A. S., Pusfitasari, E. D., Khalid, N., Febrianto, E. Y., Mardjan, S. S., ... & Kobayashi, I. (2018). "Emulsion stability of clove oil in chitosan and sodium alginate matrix". *International Journal of Food Properties*, 21(1), 566-581.
- Talón, E., Vargas, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2019). "Eugenol incorporation into thermoprocessed starch films using different encapsulating materials". *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100326.
- Taverna, M. E., Busatto, C. A., Saires, P. J., Bertero, M. P., Sedran, U. A., & Estenoz, D. A. (2022). "Bio-composite films based on alginate and rice husk tar microparticles loaded with eugenol for active packaging". *Waste and Biomass Valorization*, 13(6), 3061-3070.
- Wicochea-Rodríguez, J. D., Chalier, P., Ruiz, T., & Gastaldi, E. (2019). "Active food packaging based on biopolymers and aroma compounds: how to design and control the release". *Frontiers in chemistry*, 7, 398.