

## Efecto microbiológico y fisicoquímico en carne de cerdo recubierta con películas de nanopartículas de plata

González López D.M.<sup>1</sup>, Chamorro Ramírez F.H.<sup>1</sup>, Bustos Martínez J.A.<sup>2</sup>, Schettino Bermúdez B.S.<sup>1</sup> y Hamdan Partida A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Veterinario de Ciencia de la Carne y Salud Pública, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, Coyoacán 04960, Cd. de México, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, Coyoacán 04960, Cd. de México, México. [Correo: mcglez.d97@gmail.com](mailto:mcglez.d97@gmail.com)

**Palabras Clave:** Bacteriostático, biopolímero y calidad

### Introducción

El consumo de carne de cerdo ha ido en aumento generado una mayor demanda y por consiguiente una mayor producción, se espera que para el año 2025 la producción de carne de cerdo se duplique, sin embargo, la pérdida y desperdicio de este alimento perecedero también va en aumento, lo cual representa 52.6 millones de toneladas de carne tirada a la basura como consecuencia de alteraciones fisicoquímicas y microbiológicas durante la cadena de producción [1]. En México la fase de comercialización, transporte y almacenamiento representan el 67% del total de las pérdidas de alimentos registradas [2]. Como alternativa para disminuir las grandes pérdidas la industria se ha enfocado en la búsqueda de nuevos materiales que proporcionen un efecto antimicrobiano para conservar los alimentos, de esta forma la creación de películas a partir de biopolímeros adicionadas con nanomateriales ha tenido especial interés en los últimos años, confiriendo la capacidad de aumentar la vida útil de los alimentos, protegiéndolos de daños físicos y biológicos [3]. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto microbiológico y fisicoquímico en carne de cerdo recubierta con películas de nanopartículas de plata.

### Metodología

**Diseño experimental.** El diseño experimental consistió en la inoculación de 120 trozos de carne de cerdo del músculo *longissimus dorsi* ( $10 \pm 2$  g) con 0.07 ml de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^3$  UFC/g) asignados a tratamientos de recubrimiento; T1, emplayado comercial, T2, aspersión con AgNPs (100ppm), T3, película de Q (1%) y T4, película de Q+AgNPs (1%+100ppm), almacenados a 4° C durante 12 días, determinando el efecto bacteriostático mediante conteo en placa expresado en UFC g<sup>-1</sup>. Por otro lado, se evaluaron 64 trozos de carne de cerdo para cada periodo de tiempo a evaluar (1, 6 y 12 días de almacenamiento), determinando su pH, color y la oxidación lipídica. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

**Síntesis de nanopartículas de plata.** Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas mediante el método Turkevich, adecuada por Lee-Meisel [4] haciendo la reducción química de sales de plata utilizando nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) como precursor y citrato de sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) como agente reductor. En una placa de agitación se colocó un matraz de 1000 mL con 250 mL de agua desionizada, se adicionaron 50 mg de nitrato de plata, se agitaron a 450 rpm a temperatura de 300°C, hasta que se presentó la ebullición, una vez que la solución comenzó a hervir se le agregó citrato de sodio al 1% y se dejó en ebullición por una hora reponiendo el agua que se perdía sin rebasar los 250 mL y sin dejar que se evaporara más de 50 mL, el matraz se dejó en agitación hasta que la solución alcanzara la temperatura ambiente, agregando el resto del agua desionizada (250 mL) dejando en agitación por 5 minutos más, aforando y almacenando hasta su uso.

**Preparación de material biológico.** Se utilizaron tres cepas bacterianas: *Salmonella* ATCC 6017, *Escherichia coli* ATCC 10586, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Las cepas fueron activadas en tubos de caldo soya tripticaseína (10 mL) incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente se obtuvo una solución de 10<sup>8</sup> UFC/mL con un patrón de 0.5 Mc Farland de cada

una de las cepas en caldo soya tripticaseína con ayuda de un espectrofotómetro Densimat de Biomerieux.

**Desarrollo de películas.** Las películas fueron desarrolladas mediante el método de vaciado en caja o casting con algunas modificaciones, utilizando quitosano, ácido acético como solvente y glicerol con alcohol polivinílico como plastificante. Se preparó una solución madre diluyendo quitosano al 1%, en una solución acuosa de ácido acético al 1% agitando a temperatura ambiente a 200 rpm por 6 horas. Paralelamente se realizó una solución de alcohol polivinílico al 5% con glicerol al 5%, utilizando una placa de agitación magnética a 200 rpm durante 4 horas, fueron colocados 20nL en cajas Petri, se dejó en reposo por 12 horas a temperatura ambiente y después se colocaron en una estufa a 45° C por 24 horas y almacenadas en papel aluminio a 4° C hasta su uso. Para el desarrollo de las películas con AgNPs+Q se tomó como base los pasos previamente descritos. Sin embargo, antes del vaciado en la caja, se adicionaron 40 mL de la solución de AgNPs [500 ppm] por cada 160 mL de solución de quitosano al 1%, dejando en agitación durante 30 minutos más, para así obtener una solución final de 200 mL con una concentración de 100 ppm de AgNPs, para después realizar el vaciado bajo las mismas características antes descritas.

**Conteo en placa para muestras de carne.** La determinación y conteo microbiológico de *Salmonella* ATCC 6017, *Escherichia coli* ATCC 10586, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en la carne se realizó conforme a lo señalado por las Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Se utilizaron 10 g de cada muestra y se homogenizaron con 90 mL de agua peptonada estéril. Posteriormente se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10, sembradas en cajas Petri con agar selectivo para cada bacteria, agar SS para *Salmonella*, agar EMB para *E. coli* y agar Baird-Parker para *S. aureus*, a continuación, se incubaron a 37° C por 48 h, se realizó un conteo transcurridas las 24 y 48 h. Los resultados fueron expresados en log UFC g<sup>-1</sup>.

**Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH).** Se utilizó un potenciómetro con electrodo y cuchilla para carne previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0, tomando tres mediciones por muestra y reportados como promedio.

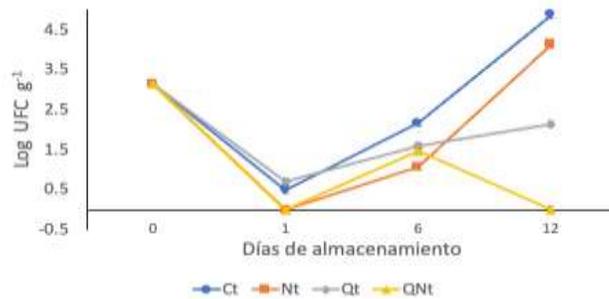
**Determinación de las características de color.** La determinación de color se realizó sobre la superficie de las muestras de carne cruda utilizando un espectrofotómetro (CM-600d KONICA MINOLTA, INC., Japón) calibrado. Se tomaron tres mediciones por muestra colocando el aparato directamente en la superficie de la carne. Los resultados fueron expresados en escala CIE determinando la variación de color, donde L\* representa luminosidad, a\* tendencia al rojo y b\* tendencia al amarillo [5].

**Determinación de la oxidación lipídica.** La oxidación de los lípidos se determinó mediante los valores de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando TBARS Assay Kit siguiendo la metodología descrita por el fabricante (Cayman CHEMICAL) con algunas modificaciones, tomando 50 mg de muestra añadiendo 500 µL de Buffer RIPA y homogeneizados, la lectura colorimétrica se realizó con un espectrofotómetro UV-VIS (Genesys 10vis) midiendo la absorbancia con una longitud de onda de 535nm. Los resultados obtenidos fueron expresados como miligramos de malondialdehído (MDA) por kilogramos de muestra.

## Resultados y discusión

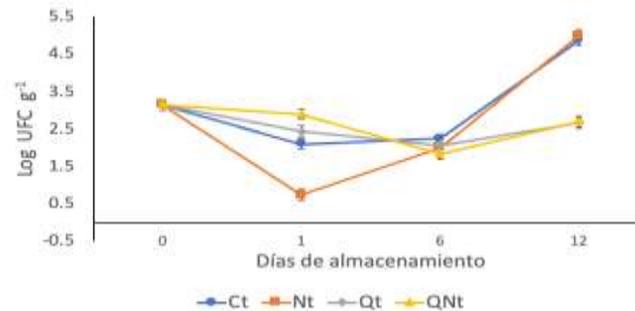
**Desafío microbiológico de carne de cerdo.** Se estudiaron los efectos de los cuatro tratamientos utilizados sobre el crecimiento de *Salmonella* ATCC 6017 aplicada en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días, los resultados se muestran en la Figura 1, se observa una fase de adaptación de 24 h. El tratamiento Ct muestra un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de 1.7

log UFC g<sup>-1</sup> a los 12 días, por el contrario, el tratamiento QNt muestra una disminución progresiva de las UFCg<sup>-1</sup> hasta el final de la prueba, mientras que los tratamientos Qt y Nt muestra un fenómeno similar al tratamiento QNt, sin embargo para el final de la prueba se observa un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de 1.2 y 4.1 log UFC g<sup>-1</sup> respectivamente.



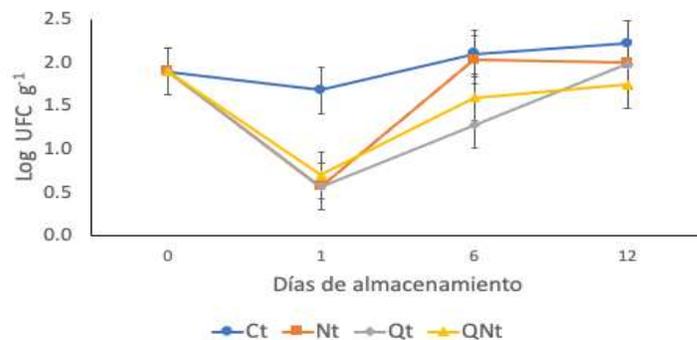
**Figura 1.** Crecimiento bacteriano de *Salmonella* ATCC 6017, inoculada en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

El crecimiento microbiológico de *E. coli* ATCC 10586 aplicada a la carne de cerdo se muestra en la Figura 2, donde se observa un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de 1.8 y 1.7 log UFC g<sup>-1</sup> en los tratamientos Ct y Nt respectivamente para el final de la prueba, mientras que los resultados en los tratamientos Qt y QNt muestran un descenso de 0.5 log UFC g<sup>-1</sup> para el final de la prueba en ambos tratamientos y una diferencia de 2.2 log UFC g<sup>-1</sup> con respecto al control al final de la prueba.



**Figura 2.** Crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 10586, inoculada en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

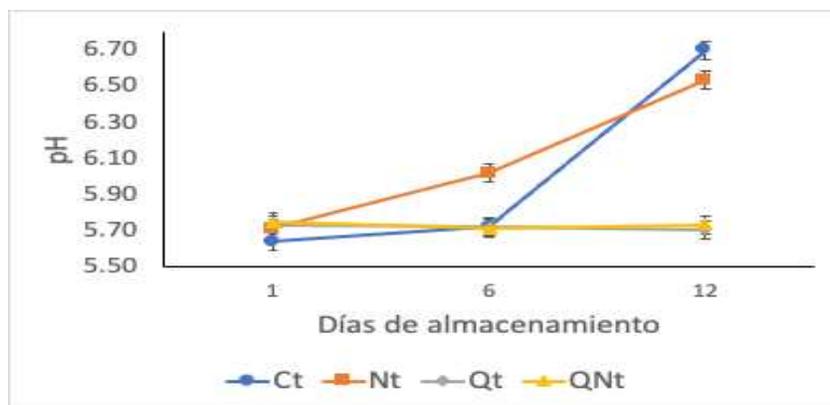
El desarrollo de *S. aureus* ATCC 29213 se muestra en la Figura 3, donde el tratamiento QNt fue el único que mostró un efecto inhibitorio contra el crecimiento bacteriano reduciendo 0.1 log UFC g<sup>-1</sup> con ligeras variaciones a través de los días de almacenamiento, mientras que los tratamientos Nt y Qt no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con respecto al control para el día 12 de almacenamiento. De tal forma que *S. aureus* fue la bacteria que mostró mayor resistencia contra las AgNPs y las películas de quitosano, siendo posible la inhibición del crecimiento solo con el efecto combinado de ambas sustancias.



**Figura 3.** Crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC 29213, inoculada en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

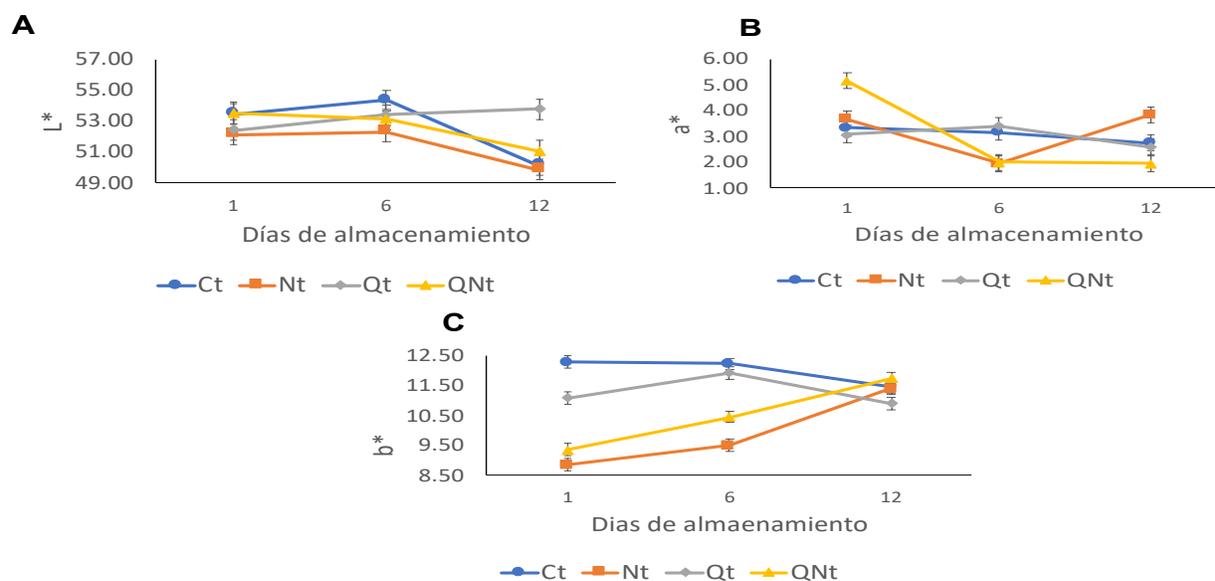
Los resultados mostrados en el tratamiento Nt demuestran el efecto bacteriostático contra las bacterias patógenas, atribuido a la pérdida gradual de AgNPs disponibles en la superficie de la carne, haciendo que la concentración inicial descienda, además de la inactivación de las AgNPs al unirse a los grupos funcionales proteicos de la carne, tal como lo mencionan [5], al reportar una débil actividad antimicrobiana de las AgNPs al estar en contacto con carne de res al observar la unión de iones  $\text{Ag}^+$  unidos a grupos proteicos. La carne almacenada con películas AgNPs+Q mostraron los mejores resultados de inhibición microbiana atribuibles al efecto sinérgico entre las propiedades antimicrobianas propias de cada material, los efectos bacteriostáticos mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al control al final de la prueba, observando un efecto bacteriostático, gracias al acoplamiento de las AgNPs a la matriz sólida del quitosano y la disposición de las AgNPs al estar en contacto con la carne [6]. Por otro lado, se ha reportado que los mayores efectos de inhibición se muestran en bacterias Gram negativas en comparación con bacterias Gram positivas, debido a la estructura de su pared celular, retrasando la interacción de las AgNPs con las moléculas intracelulares, haciendo imposible la inactivación en la replicación de ADN [7].

**pH de carne.** Los resultados de pH de la carne de cerdo almacenada a 4° C durante 12 días se muestran en la Figura 4. El pH de la carne de cerdo de los tratamientos Qt y QNt se mantuvieron estables durante los 12 días de almacenamiento en refrigeración a 4° C. Los valores de pH del tratamiento Ct mostraron un aumento de 0.98 para el final de la prueba. El aumento en los valores de pH en los tratamientos Ct y Nt es atribuido principalmente por la presencia de altos niveles de compuestos nitrogenados volátiles, producidos por la degradación de proteínas produciendo aminas orgánicas por acción de microorganismos y enzimas [8], donde la descomposición de los aminoácidos en la carne de cerdo por enzimas proteolíticas microbianas endógenas da como consecuencia la formación de amoniaco alcalino y aminas (trimetilamina) con el aumento del pH. La estabilidad mostrada en los tratamientos Qt y QNt se debió a la actividad antibacteriana tanto de las AgNPs como del quitosano, estos resultados concordaron con lo mostrado por [6] al observar una inhibición del crecimiento bacteriano natural de carne de res al utilizar películas con AgNPs.



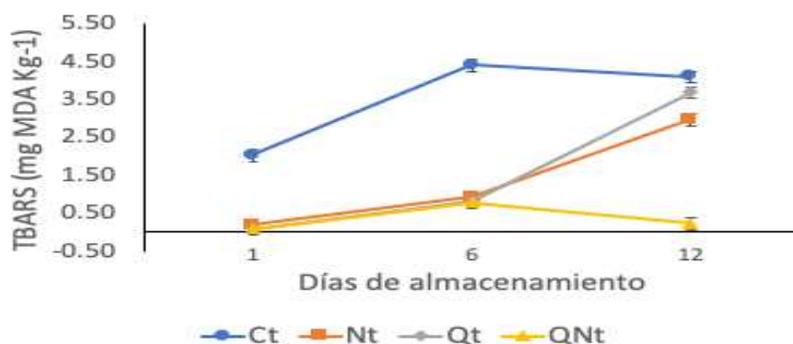
**Figura 4.** Cambios de pH en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

**Color de carne.** Las variaciones en los valores de color de la carne de cerdo tratada y almacenada durante 12 días se presentan en la Figura 5, donde se puede observar un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) en los valores de  $L^*$  en los tratamientos Ct (3.30), QNt (2.45) y Nt (2.27) para el día 12 de almacenamiento, mientras que el tratamiento Qt aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) con respecto al resto de los tratamientos para el final del almacenamiento. Los valores de  $a^*$  no muestran diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) a través del tiempo en los tratamientos Ct, Nt y Qt. La aplicación de las películas de AgNPs+Q mejoró la tendencia al rojo de la carne de cerdo mostrando los valores más altos y evitando la decoloración los primeros días de almacenamiento. La tendencia de aumento de  $b^*$  durante el almacenamiento en la carne de cerdo del tratamiento QNt es atribuido a la cantidad de metamioglobina en la carne que a su vez esta relacionada con el pH, de tal forma que al tener pH bajos la mioglobina es más propensa a oxidarse y la metamioglobina aumenta. Las variaciones en la tendencia del color rojo en la carne son atribuidas a los cambios químicos que sufre la mioglobina al aumentar el tiempo de almacenamiento, siendo la oxidación de oximioglobina el proceso que afecta en mayor medida.



**Figura 5.** Cambios en las características de color. Luminosidad ( $L^*$ ) (A), tendencia al rojo ( $a^*$ ) (B) y tendencia al amarillo ( $b^*$ ) (C) en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

**Oxidación lipídica de carne.** Los resultados se muestran en la Figura 6. Tras el almacenamiento se puede observar un incremento progresivo con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento Ct y el resto de los tratamientos (Nt, Qt y QNt) desde el día. Para el día 12, los tratamientos Qt y Nt mostraron un aumento exponencial, sin embargo, dicho aumento no rebasó al Ct, este aumento representó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre todos los tratamientos. Las bajas fluctuaciones en la tasa de oxidación lipídica mostradas en el tratamiento QNt es atribuida a la actividad sinérgica entre el quitosano y las AgNPs, las cuales terminan con las reacciones en cadena de los radicales libres al donar electrones volviéndolos productos más estables [3] sosteniendo el efecto antioxidante por más tiempo, esto indicó que el recubrimiento con películas de quitosano con AgNPs era una forma eficaz de reducir la oxidación lipídica de la carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días.



**Figura 6.** Cambios de oxidación lipídica (TBARS) en carne de cerdo almacenada a 4° C por 12 días. Ct: Control; Nt: AgNPs; Qt: Quitosano; QNt: AgNPs+Q.

## Conclusión

El uso de películas de AgNPs+Q retrasó eficientemente el crecimiento bacteriano controlando con éxito la carga microbiana de bacterias patógenas durante los 12 días de almacenamiento, dicho efecto podría indicar una extensión de la vida útil de la carne de cerdo fresca, concordando con la estabilidad en los resultados de pH, color y oxidación lipídica, siendo posible utilizar dichas películas como materiales de recubrimiento antimicrobiano en la industria alimentaria.

## Referencias

1. Cruz-Monterrosa, R. G., Reséndiz-Cruz, V., Landa-Salgado, P., Jiménez-Guzmán, J., Díaz-Ramírez, M., Miranda-de la Lama, G. & García-Garibay, J. M. (2017). Nanotechnology in the food industry: nanoparticles used in meat conservation. *Agroproductividad*, **10** (10): 39-46.
2. AGROCOF. 2017. Desperdicio de alimentos en México, la dimensión del problema. Disponible en <https://agrocof.com/desperdicio-de-alimentos-en-mexico/>. Consultado el 18 de febrero de 2021.
3. Yong, H., Wang, X., Bai, R., Miao, Z., Zhang, X., & Liu, J. (2019). Development of antioxidant and intelligent pH-sensing packaging films by incorporating purple-fleshed sweet potato extract into chitosan matrix. *Food Hydrocolloids*, **90**, 216-224.
4. P.C. Lee y D. J. Meisel. (1982). Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Physical Chemistry*, **86**, 3391-3395.
5. Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M. C., Morris, M. A., Padmanabhan, S. C., Cummins, E., & Kerry, J. P. (2016). The potential application of antimicrobial silver polyvinyl chloride nanocomposite films to extend the shelf-life of chicken breast fillets. *Food and Bioprocess Technology*, **9** (10): 1661-1673.
6. Wang, W., Yu, Z., Alsammarraie, F. K., Kong, F., Lin, M., & Mustapha, A. (2020). Properties and antimicrobial activity of polyvinyl alcohol-modified bacterial nanocellulose packaging films incorporated with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, **100**, 105411, 1-10.
7. Marchiore, N. G., Manso, I. J., Kaufmann, K. C., Lemes, G. F., de Oliveira Pizolli, A. P., Droval, A. A. & Leimann, F. V. (2017). Migration evaluation of silver nanoparticles from antimicrobial edible coating to sausages. *LWT-Food Science and Technology*, **76**, 203-208.

[8] Alizadeh-Sani, M., Mohammadian, E., & McClements, D. J. (2020). Eco-friendly active packaging consisting of nanostructured biopolymer matrix reinforced with TiO<sub>2</sub> and essential oil: Application for preservation of refrigerated meat. *Food chemistry*, 322, 126782, 1-9.