

**ESTRATEGIAS PARA PRESERVAR ARÁNDANOS  
UTILIZANDO ENVASES BIODEGRADABLES**

**por**

**María Julieta Bof**

Tesis para obtener el grado académico de

**DOCTOR EN INGENIERÍA**

Mención en Ciencia y Tecnología de Alimentos

de las Facultades de

Ciencias de la Alimentación, Ciencias Agropecuarias e Ingeniería

de la

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ENTRE RÍOS**



Director de la Tesis: Dra. María Alejandra García

Co-director de la Tesis: Dra. Delia Elisa Locaso

**Junio de 2018**

**Universidad Nacional de Entre Ríos**

**Facultad de Ciencias de la Alimentación**

Como miembros del Jurado de Tesis certificamos que hemos leído el documento de la Tesis preparada por la Ing. María Julieta Bof, titulada “*Estrategias para preservar arándanos utilizando envases biodegradables*” y recomendamos sea aceptada como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Ingeniería, Mención en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

La aprobación final y aceptación de este documento de Tesis estará condicionada a la presentación de la copia final ante el Comité Académico del Doctorado en Ingeniería de la UNER.

Concordia, junio de 2018

---

Concordia, junio de 2018

---

Certificamos haber leído el documento de la Tesis preparada bajo nuestra dirección y recomendamos sea aceptada como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Ingeniería, Mención en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

1

---

Director de Tesis: Dra. María Alejandra  
García

---

Co-Director de Tesis: Dra. Delia Locaso

Concordia, junio de 2018

---

<sup>1</sup> Sólo si corresponde

## DECLARACIÓN DEL AUTOR

Este documento de Tesis ha sido presentado y aprobado como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor ante la Universidad Nacional de Entre Ríos. Un ejemplar del mismo ha sido remitido e indexado en la Biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Alimentación para que esté disponible a sus lectores bajo las condiciones estipuladas por el Reglamento de la mencionada Biblioteca.

El presente trabajo se desarrolló en la **Facultad de Ciencias de la Alimentación** (FCAL) de la Universidad Nacional de Entre Ríos y en el **Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos** (CIDCA) de la Facultad de Ciencias Exactas en la Universidad Nacional de La Plata. Asimismo, el Capítulo 4 se realizó en el **Instituto de Innovación en Alimentos** (IIA), situado en la Ciudad Politécnica de la Innovación de la Universidad Politécnica de Valencia (Valencia, España). El trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Alejandra García y la Dra. Delia Locaso.

Los resultados del trabajo de investigación desarrollado derivaron en la escritura de esta Tesis de doctorado titulada ESTRATEGIAS PARA PRESERVAR ARÁNDANOS UTILIZANDO ENVASES BIODEGRADABLES, se hicieron presentaciones en congresos nacionales e internacionales y se publicaron artículos en revistas internacionales con referato.

Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. (2015). Bof, M.J., Bordagaray, V.C., Locaso, D.E. & García, M.A. *Food Hydrocolloids*, 51, 281-294.

Grapefruit Seed Extract and Lemon Essential Oil as Active Agents in Corn Starch-Chitosan Blend Films. (2016). Bof, M.J., Jiménez, A., Locaso, D.E., García, M.A. & Chiralt, A. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 2033-2045.



**A MI PADRE Y A MI HIJO**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que han sido parte de este proceso de aprendizaje y a los que de una u otra forma han iluminado mi camino.

En primer lugar a mi Directora Dra. Alejandra García por su dedicación, su predisposición incondicional y su permanente acompañamiento; y a mi Co-directora Dra. Delia Locaso por recibirme abiertamente en un principio, por su apertura y sus aportes, tanto para el trabajo como para la vida.

A mi familia, especialmente a mi compañero de la vida, Alcides; a mis padres, gracias a quienes soy quien soy; a mis tíos, Elba y Jorge; y a mis hermanos: Naty por recibirme en La Plata cada vez que viajaba y Martín por ser tan compañero.

A mis compañeros de laboratorio, Vale, Vane, Gustavo, Lauro, Paula, Ornella, Alejandro, Franco.

A los compañeros de otros laboratorios, a Vanesa, Mercedes y Lucas.

A la Facultad de Ciencias de la Alimentación y al ex Decano, Gustavo Teira, por permitirme realizar esta Tesis en sus instalaciones.

Al CIDCA, a Noemí, a Florencia, a Sandra, a Facundo y demás personas de esta Institución que siempre me han recibido tan atentamente.

A la Dra. Amparo Chiralt, a Alberto, a Cristina, a Emma, a Justine y compañeros de la Universidad Politécnica de Valencia por enseñarme tanto.

# Índice

Resumen .....	XXVII
<b>I. Introducción General.....</b>	<b>2</b>
I.1 Arándanos .....	2
I.1.1 Generalidades: Características y Propiedades .....	2
I.1.2 Producción .....	3
I.1.3 Cultivo.....	5
I.1.4 Mercado y Comercialización .....	5
I.1.5 Alteraciones de los arándanos.....	6
I.1.5.1 Podredumbre por <i>Alternaria</i> .....	7
I.1.5.2 Podredumbre gris .....	8
I.1.5.3 Otras alteraciones .....	8
I.1.6 Tratamientos poscosecha .....	9
I.2 Envases.....	11
I.2.1 Generalidades.....	11
I.2.2 Tendencias en el uso de envases .....	13
I.2.3 Generación y degradación de residuos plásticos .....	14
I.3 Películas y recubrimientos biodegradables .....	15
I.3.1 Componentes.....	17
I.3.1.1 Hidrocoloides .....	17
I.3.1.1.1 Almidón de maíz .....	17
I.3.1.1.1.1 Proceso de obtención de películas biodegradables de almidón.....	19
I.3.1.1.1.1.2 Propiedades de las películas de almidón.....	21
I.3.1.1.1.2 Quitosano.....	21
I.3.1.2 Lípidos.....	22
I.3.1.3 Películas compuestas.....	23
I.3.2 Aplicaciones de las películas biodegradables .....	24
I.4 Justificación del tema .....	25
I.5 Planificación.....	27
I.6 Referencias bibliográficas .....	30

<b>II. Objetivos e Hipótesis .....</b>	<b>41</b>
II.1 Objetivo general.....	41
II.2 Objetivos específicos .....	41
II.3 Hipótesis de trabajo.....	41
<b>Capítulo 1. Caracterización de los Componentes: Quitosano y Almidón de maíz . 44</b>	
1.1 Introducción.....	44
1.1.1 Quitosano .....	44
1.1.1.1 Peso molecular y grado de desacetilación .....	45
1.1.1.2 Actividad antimicrobiana del quitosano .....	46
1.1.2 Almidón de maíz .....	47
1.1.2.1 Estructura de los gránulos.....	48
1.1.2.2 Gelatinización y Retrogradación .....	49
1.2 Materiales y métodos.....	50
1.2.1 Determinación del peso molecular medio viscosimétrico de los quitosanos utilizados .....	51
1.2.2 Determinación del grado de desacetilación de los quitosanos utilizados.....	53
1.2.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier .....	54
1.2.4 Caracterización del almidón de maíz .....	55
1.2.4.1 Determinación del contenido de amilosa y amilopectina.....	55
1.2.4.2 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido .....	56
1.2.4.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier .....	57
1.2.5 Análisis estadístico .....	57
1.3 Resultados y discusión .....	57
1.3.1 Peso molecular de los quitosanos utilizados .....	57
1.3.1.1 Determinación del grado de desacetilación .....	59
1.3.1.2 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier.....	60
1.3.2 Caracterización del almidón de maíz .....	63
1.3.2.1 Determinación del contenido de amilosa y amilopectina.....	63
1.3.2.2 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido .....	63
1.3.2.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier .....	63
1.4 Conclusión.....	65
1.5 Referencias bibliográficas .....	66

<b>Capítulo 2. Películas de un solo componente y películas compuestas.....</b>	<b>71</b>
2.1 Introducción.....	71
2.1.2 Métodos de obtención de las películas.....	71
2.1.3 Aplicaciones de las películas biodegradables en el envasado de alimentos: recopilación bibliográfica.....	72
2.2 Materiales y métodos.....	73
2.2.1 Formulación de las suspensiones formadoras de films.....	73
2.2.2 Reología de las suspensiones formadoras de films.....	73
2.2.2.1 Ensayos rotacionales.....	74
2.2.2.2 Ensayos oscilatorios.....	76
2.2.3 Obtención de las películas.....	78
2.2.4 Propiedades de las películas.....	79
2.2.4.1 Contenido de humedad y espesor.....	79
2.2.4.2 Permeabilidad al vapor de agua.....	79
2.2.4.2 Solubilidad.....	81
2.2.4.3 Análisis dinámico mecánico (DMA).....	82
2.2.4.3.1 Barrido de frecuencias.....	82
2.2.4.3.2 Barrido de esfuerzo.....	82
2.2.4.4 Espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	83
2.2.4.5 Propiedades mecánicas.....	83
2.2.4.6 Color.....	88
2.2.5 Análisis estadístico.....	88
2.3 Resultados y discusión.....	89
2.3.1 Reología de las suspensiones formadoras de film.....	89
2.3.1.1 Análisis para películas de un solo componente.....	89
2.3.1.2 Efecto del glicerol.....	91
2.3.2 Efecto del tiempo de almacenamiento de las suspensiones filmogénicas.....	93
2.3.3 Propiedades de las películas.....	95
2.3.3.1 Espesor y humedad.....	95
2.3.3.2 Permeabilidad al vapor de agua.....	96
2.3.3.3 Solubilidad.....	98
2.3.3.4 Espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	99
2.3.3.5 Análisis dinámico mecánico (DMA): barrido de frecuencias.....	103
2.3.3.6 Propiedades mecánicas.....	106

2.3.3.6.1 Tracción .....	106
2.3.3.7 Color .....	111
2.4 Conclusión .....	115
2.5 Referencias bibliográficas .....	116

**Capítulo 3: Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón ..... 121**

3.1 Introducción.....	121
3.2 Materiales y Métodos .....	122
3.2.1 Caracterización de las SFF.....	123
3.2.2 Obtención de las películas.....	124
3.2.3 Propiedades de las películas.....	124
3.2.3.1 Color superficial .....	124
3.2.3.2 Propiedades mecánicas a la punción .....	124
3.2.3.3 Capacidad de barrera al UV.....	125
3.2.3.4 Transparencia y opacidad .....	125
3.2.3.5 Capacidad y resistencia del termosellado.....	126
3.2.4 Análisis estadístico.....	129
3.3 Resultados y discusión .....	129
3.3.1 Reología de las suspensiones formadoras de films.....	129
3.3.2 Propiedades de las películas compuestas .....	132
3.3.3 Propiedades relevantes para el desarrollo de envases biodegradables.....	139
3.3.3.1 Propiedades ópticas: color.....	139
3.3.3.2 Capacidad de barrera al UV, transparencia y opacidad.....	141
3.3.3.3 Propiedades mecánicas a la punción .....	144
3.3.3.4 Capacidad de termosellado.....	145
3.3.4 Selección de la formulación para el diseño de envases: análisis de costos de materias primas .....	148
3.4 Conclusión.....	150
3.5 Referencias bibliográficas .....	152

**Capítulo 4: Desarrollo de películas compuestas activas ..... 157**

4.1 Introducción.....	157
4.2 Materiales y Métodos .....	159

4.2.1	Caracterización de los compuestos activos .....	159
4.2.1.1	Caracterización del aceite esencial de limón (AEL) .....	159
4.2.1.2	Caracterización del extracto de semillas de pomelo (ESP) .....	161
4.2.2	Obtención y caracterización de las suspensiones filmógenicas con compuestos activos.....	163
4.2.2.1	Estudio de la estabilidad de las emulsiones.....	167
4.2.2.1.1	Ensayos de dispersión de luz .....	169
4.2.2.1.2	Tamaño de gotas .....	170
4.2.2.1.3	Tensión superficial.....	170
4.2.2.1.4	Observación microscópica .....	171
4.2.2.2	Caracterización reológica de las SFFs.....	171
4.2.3	Obtención de las películas compuestas activas .....	172
4.2.4	Caracterización de las películas activas compuestas.....	173
4.2.4.1	Espesor, humedad y solubilidad .....	173
4.2.4.2	Retención del aceite esencial en las películas conteniendo AEL .....	174
4.2.4.3	Desarrollo de color superficial .....	174
4.2.4.4	Propiedades de barrera.....	175
4.2.4.4.1	Permeabilidad al O <sub>2</sub> .....	175
4.2.4.4.2	Permeabilidad al vapor de agua .....	175
4.2.4.5	Propiedades mecánicas .....	176
4.2.4.6	Análisis térmico .....	176
4.2.4.6.1	Calorimetría diferencial de barrido.....	176
4.2.4.6.2	Análisis termogravimétrico (TGA).....	177
4.2.4.7	Análisis microestructural .....	178
4.2.4.7.1	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	178
4.2.4.7.2	Microscopía electrónica de barrido SEM .....	178
4.2.5	Evaluación de la capacidad antioxidante .....	178
4.2.6	Estudio de la capacidad antimicrobiana .....	179
4.2.7	Análisis estadístico.....	180
4.3	Resultados y Discusión.....	180
4.3.1	Caracterización de los componentes activos .....	180
4.3.1.1	Caracterización del aceite esencial de limón .....	180
4.3.1.2	Caracterización del extracto de semillas de pomelo.....	183
4.3.2	Estudio de la estabilidad de las SFFs obtenidas por emulsificación .....	184

4.3.2.1 Tensión superficial y tamaño de gota .....	184
4.3.2.2 Dispersión de luz .....	187
4.3.3 Caracterización reológica de las SFFs .....	191
4.3.4 Obtención de las películas activas compuestas .....	192
4.3.5 Caracterización de las películas compuestas activas.....	193
4.3.5.1 Espesor, humedad y solubilidad .....	193
4.3.5.2 Retención de aceite esencial en las películas.....	194
4.3.5.3 Desarrollo de color superficial .....	195
4.3.5.4 Microscopía SEM: análisis de sección transversal y superficial.....	196
4.3.5.5 Propiedades mecánicas y de barrera .....	197
4.3.5.6 Propiedades térmicas .....	199
4.3.5.7 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier .....	202
4.3.5.8 Análisis de componentes principales.....	204
4.3.6 Evaluación de la capacidad antioxidante .....	205
4.3.7 Estudio de la capacidad antimicrobiana .....	205
4.4 Conclusión.....	207
4.5 Referencias bibliográficas .....	209

<b>Capítulo 5. Aplicación de películas como envase para la conservación de arándanos .....</b>	<b>217</b>
5.1 Introducción.....	217
5.2 Materiales y Métodos .....	218
5.2.1 Obtención de los envases activos biodegradables.....	218
5.2.2 Estudio de conservación de arándanos.....	219
5.2.2.1 Almacenamiento de las muestras .....	221
5.2.2.2 Pérdidas de peso .....	222
5.2.2.3 Firmeza .....	222
5.2.2.4 Tasa respiratoria .....	224
5.2.2.5 Calidad interna.....	225
5.2.2.6 Color superficial .....	225
5.2.2.7 Actividad antioxidante.....	226
5.2.2.8 Deterioro fúngico.....	227
5.2.2.9 Características organolépticas .....	228
5.2.3 Ensayos mediante Inoculación artificial .....	228



5.2.3.1 Metodología de Inoculación .....	228
5.2.3.2 Preparación y almacenamiento de las muestras .....	229
5.3.2.3 Evaluación del deterioro y la gravedad de la enfermedad .....	230
5.2.4 Análisis estadístico .....	231
5.3 Resultados y discusión .....	231
5.3.1 Estudios de conservación de arándanos .....	231
5.3.1.1 Calidad interna.....	231
5.3.1.2 Pérdida de peso .....	233
5.3.1.3 Firmeza .....	236
5.3.1.4 Tasa respiratoria .....	238
5.3.1.5 Color superficial .....	241
5.3.1.6 Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos.....	243
5.3.1.7 Deterioro fúngico.....	245
5.3.1.8 Características organolépticas .....	248
5.3.2 Evaluación de podredumbres mediante inoculación artificial de la fruta ....	249
5.4 Conclusión.....	251
5.5 Referencias bibliográficas .....	252
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>260</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>263</b>
Determinación de la actividad antifúngica y de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos activos utilizados .....	263
Referencias bibliográficas .....	266

# Índice de tablas

## Introducción

Tabla I.1: Otros tipos de deterioros en arándanos. ....	9
Tabla I.2: Clasificación de los materiales de envases. ....	12
Tabla I.3: Aplicaciones de películas y recubrimientos en frutas y verduras frescas o mínimamente procesados. ....	25

## Capítulo 1

Tabla 1.1: Contenido de amilosa y amilopectina de diversas fuentes de almidón. ....	49
Tabla 1.2: Tiempos de recorrido de soluciones de quitosano en el viscosímetro capilar. ....	57
Tabla 1.3: Peso molecular y grado de desacetilación de los quitosanos utilizados. ....	58
Tabla 1.4: Determinación del DD de quitosano de MPM: puntos de inflexión obtenidos en la valoración potenciométrica. ....	59
Tabla 1.5: Grupos funcionales y longitud de onda característica en el espectro. ....	61
Tabla 1.6: Grados de acetilación y desacetilación de los quitosanos calculados mediante FTIR. ....	62
Tabla 1.7: Parámetros térmicos asociados a la gelatinización del almidón de maíz nativo. ....	63

## Capítulo 2

Tabla 2.1: Aplicaciones de películas y recubrimientos para conservación de alimentos. ....	72
Tabla 2.2: Humedades relativas conseguidas con soluciones saturadas de sales a 5°C. ....	80
Tabla 2.3: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de distinto peso molecular. ....	91
Tabla 2.4: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de bajo peso molecular con y sin el agregado de glicerol. ....	92
Tabla 2.5: Valores de los módulos elástico y viscoso a 1 Hz para suspensión filmogénica de almidón de maíz almacenado a distintos tiempos. ....	94

Tabla 2.6: Valores de los módulos elástico y viscoso a 1 Hz para suspensión filmogénica de almidón de maíz con glicerol almacenado a distintos tiempos.....	95
Tabla 2.7: Espesor y humedad de películas a base de almidón, quitosano y la mezcla de ambos. ....	96
Tabla 2.8: Parámetros dinámicos mecánicos para películas plastificadas formuladas con almidón de maíz, quitosano de distinto peso molecular y la mezcla de ambos en iguales proporciones. ....	111

### Capítulo 3

Tabla 3.1: Nomenclatura de las SFF y de las películas obtenidas.....	123
Tabla 3.2: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de bajo y medio peso molecular (BPM y MPM) en distintas proporciones obtenidas con el modelo matemático de Ostwald de Waele.....	130
Tabla 3.3: Propiedades de las películas compuestas obtenidas con quitosano BPM.	133
Tabla 3.4: Propiedades de las películas compuestas obtenidas con quitosano MPM. ....	134
Tabla 3.5: Parámetros mecánicos a la tracción obtenidos mediante ensayos en texturómetro para películas formuladas con quitosano BPM. ....	138
Tabla 3.6: Capacidad de barrera al UV de películas compuestas.....	143
Tabla 3.7: Transparencia y opacidad de películas con distinta proporción de AM y Q.....	144
Tabla 3.8: Propiedades mecánicas a la punción de películas compuestas (AM:Q). ..	144
Tabla 3.9: Resultados del ensayo de resistencia del termosellado para películas de un solo componente y compuestas.....	148
Tabla 3.10: Contenido y costos de las formulaciones. ....	150
Tabla 3.11: Resumen y valoración de las propiedades de las películas para su aplicación como envases.....	151

### Capítulo 4

Tabla 4.1: Clasificación y uso de emulsionantes de acuerdo a su HLB.....	165
--	-----

Tabla 4.2: Fracciones másicas (X) de los distintos componentes en las distintas formulaciones en relación al contenido total de sólidos y masa equivalente de sólidos (Se) vertidos por placa (g). .....	173
Tabla 4.3: Diámetro medio superficial $D_{3,2}$ y tensión superficial para formulaciones con y sin agregado de tensioactivos. ....	185
Tabla 4 4: Parámetros reológicos del modelo de Ostwald de Waale y viscosidad aparente a $100 \text{ s}^{-1}$ de las suspensiones formadoras de películas. ....	191
Tabla 4.5: Contenido de humedad, solubilidad y espesor de las películas compuestas activas. ....	194
Tabla 4.6: Parámetros de color, brillo y transparencia de las películas compuestas activas. ....	195
Tabla 4.7: Propiedades mecánicas a la tracción de películas con componentes activos. ....	198
Tabla 4.8: Propiedades de barrera al vapor de agua (PVA) y al oxígeno ( $\text{PO}_2$ ) de las películas. ....	198
Tabla 4.9: Temperatura de degradación del polímero, peso residual de degradación a $500^\circ\text{C}$ y temperatura de transición vítrea del almidón ( $T_g$ ) para las películas desarrolladas. ....	201
Tabla 4.10: Actividad antimicrobiana de películas activas y AEL y ESP puros frente a algunos microorganismos. ....	206

## Capítulo 5

Tabla 5.1: Aplicación de envases para conservación de arándanos correspondientes al ensayo 1.....	220
Tabla 5.2: Aplicación de envases para conservación de arándanos correspondientes al ensayo 2.....	220
Tabla 5.3: Tasa respiratoria y cociente respiratorio a $25^\circ\text{C}$ de arándanos variedad Misty recién cosechados (inicial) y luego de finalizar el período de almacenamiento refrigerado.....	239
Tabla 5.4: Tasa respiratoria a $25^\circ\text{C}$ de arándanos variedad Emerald recién cosechados (inicial) y luego de finalizar el período de almacenamiento refrigerado. ....	240
Tabla 5.5: Contenido de fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante de arándanos var. Emerald almacenados 30 días a $1^\circ\text{C}$ y 7 días a $20^\circ\text{C}$ . ....	244

Tabla 5.6: Características organolépticas de arándanos var. Emerald envasados y conservados 30 d en refrigeración + 7 d a temperatura ambiente.....	248
Tabla 5.7: Podredumbres por <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i> en arándanos Misty inoculados y almacenados en cámara húmeda a 20°C durante 9 días. ....	249

# Índice de Figuras

## Introducción

Figura I.1: Distribución porcentual de área implantada en Argentina.	4
Figura I.2: Evolución de la superficie implantada en Argentina.	4
Figura I.3: Alteración debida a <i>Alternaria tenuissima</i> .	8
Figura I.4: Podredumbre gris en arándano.	8
Figura I.5: Materiales Biodegradables obtenidos a partir de fuentes renovables.	12
Figura I.6: Materiales Biodegradables obtenidos a partir de fuentes no renovables.	13
Figura I.7: Clasificación de residuos urbanos.	15
Figura I.8: Transferencias que ocurren en los alimentos.	16
Figura I.9: Modelo de película compuesta laminada	23
Figura I.10: Modelo de película compuesta obtenida a partir de una emulsión.	23
Figura I.11: Esquema de la planificación del trabajo de investigación.	29

## Capítulo 1

Figura 1.1: Reacción de desacetilación de quitina para obtener quitosano.	44
Figura 1.2: Estructura del quitosano poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosal].	45
Figura 1.3: Estructura de la amilosa.	48
Figura 1.4: Estructura de la amilopectina.	48
Figura 1.5: Viscosímetro capilar y dispositivo para determinación del peso molecular medio viscosimétrico.	51
Figura 1.6: Termograma típico obtenido por DSC. $T_0$ : temperatura de inicio; $T_p$ : temperatura de pico; y área de pico proporcional a la entalpía $\Delta H$ .	56
Figura 1.7: Viscosidad relativa de Huggins y Kramer en función de la concentración de polímero.	58
Figura 1.8: Curva de titulación potenciométrica y primera derivada.	60
Figura 1.9: Espectros de absorción de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ obtenidos mediante espectroscopía de IR con transformada de Fourier para quitosano bajo peso molecular (BPM), quitosano peso molecular medio (MPM) y quitosano de alto peso molecular (APM).	61
Figura 1.10: Espectros de infrarrojo para almidón de maíz nativo.	64

## Capítulo 2

Figura 2.1: Geometría plato-plato utilizada para la caracterización reológica.....	74
Figura 2.2: Clasificación de comportamiento reológico de fluidos.....	75
Figura 2.3: Comportamiento típico de un polímero al realizar un barrido de frecuencias (Fuente: Barnes, H.A.; A Handbook of Elementary Rheology; University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth, 2000).....	77
Figura 2.4: Esquema del método de casting para obtención de películas. ....	78
Figura 2.5: Esquema de interacciones que ocurren entre un alimento, su envase y el entorno cuando se emplea un material polimérico para el envasado.....	79
Figura 2.6: Celdas de permeación utilizadas para determinación de la permeabilidad al vapor de agua de películas. ....	81
Figura 2.7: Preparación de las muestras para analizar en espectrofotómetro FTIR .....	83
Figura 2.8: Progreso típico de la probeta en un ensayo de tracción. ....	84
Figura 2.9: Curva de esfuerzo vs. deformación típica de materiales a) frágiles y b) dúctiles o flexibles. ....	84
Figura 2.10: Patrones de comportamiento mecánico a la tracción para distintos materiales.....	85
Figura 2.11: Perfil mecánico, esfuerzo ( $\sigma$ ) vs. deformación ( $\epsilon$ ), comparando el comportamiento real y el comportamiento si no se hubiese producido el cuello.....	86
Figura 2.12: Gráfico esfuerzo ( $\sigma$ ) vs deformación ( $\epsilon$ ) para materiales dúctiles. ....	86
Figura 2.13: Sistema de mordazas utilizado para los ensayos de resistencia a la tracción de las películas. ....	87
Figura 2.14: Medición de color de films con colorímetro triestímulo. ....	88
Figura 2.15: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo $\tau$ (Pa) en función de la velocidad de rotación $\gamma$ ( $s^{-1}$ ), para: (A) suspensión de almidón gelatinizada; (B) soluciones de quitosano de distinto peso molecular. ....	90
Figura 2.16: Curva de comportamiento de flujo para: (A) suspensión de almidón con y sin glicerol; (B) solución de quitosano con y sin glicerol.....	92
Figura 2.17: Curvas de comportamiento de flujo para suspensiones filmogénicas de almidón de maíz a tiempo 0 y luego de 24 horas de almacenamiento en condiciones de refrigeración.....	93

Figura 2.18: Evolución de los módulos $G'$ o $G''$ para una suspensión filmogénica de almidón de maíz sin glicerol. ....	94
Figura 2.19: Permeabilidad al vapor de agua de películas de un solo componente (almidón de maíz AM, y quitosano Q) y películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular. ....	97
Figura 2.20: Solubilidad de películas de un solo componente (almidón de maíz AM y quitosano Q) y de películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular. ....	98
Figura 2.21: Espectros FTIR obtenidos para las películas de quitosano de distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: medio peso molecular y APM: alto peso molecular). Ventanas espectrales: A) $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ y B) $2000-800\text{ cm}^{-1}$ . ....	100
Figura 2.22: Espectros FTIR para películas compuestas de almidón de maíz (AM) y quitosano (Q) con distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: medio peso molecular y APM: alto peso molecular). Ventanas espectrales: A) $4000-2500\text{ cm}^{-1}$ y B) $2000-800\text{ cm}^{-1}$ . ....	103
Figura 2.23: Espectro dinámico-mecánico de películas de A: quitosano de distinto peso molecular y B: almidón maíz (AM) y películas compuestas por ambos biopolímeros en igual proporción (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). ....	105
Figura 2.24: Perfil mecánico para películas de almidón de maíz, de quitosano y películas compuestas. ....	106
Figura 2.25: Esfuerzo de tensión (MPa) para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). ....	107
Figura 2.26: Porcentaje de deformación para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). ....	107
Figura 2.27: Módulo de elasticidad (MPa) obtenido para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). ....	108



Figura 2.28: Curvas de comportamiento de esfuerzo en función de la deformación para películas de almidón de maíz, de quitosano (BPM) y películas compuestas.....	110
Figura 2.29: Apariencia de películas de almidón de maíz (AM), de quitosano (Q) y de películas compuestas 50:50. ....	112
Figura 2.30: Parámetros de color en películas de almidón de maíz (AM), de quitosano (Q) y de películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). A: Luminosidad; B: Parámetro de color b*; y C: Diferencias de color $\Delta E$ en unidades arbitrarias.....	114

### Capítulo 3

Figura 3.1: Perfil típico obtenido durante el ensayo de punción.....	125
Figura 3.2: Tipos de Fallas en materiales termosellados, de acuerdo a la norma ASTM F88-00.....	127
Figura 3.3: Muestra sellada para el ensayo de resistencia del sellado. Adaptado de Das y col. (2016).....	128
Figura 3.4: Disposición de las muestras en las mordazas A/G en texturómetro para ensayo de resistencia del termosellado.....	128
Figura 3.5: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo $\tau$ (Pa) en función de la velocidad de rotación $\dot{\gamma}$ ( $s^{-1}$ ), para películas compuestas. La nomenclatura de las formulaciones compuestas se corresponde a la Tabla 3.1.....	129
Figura 3.6: Módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) para formulaciones compuestas obtenidos a 1 Hz. La nomenclatura de las SFF corresponde a la Tabla 3.1.....	131
Figura 3.7: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo $\tau$ (Pa) en función de la velocidad de deformación $\dot{\gamma}$ ( $s^{-1}$ ), para una suspensión filmogénica de almidón y una SFF compuesta, recién preparada (0 h) y a luego de 24 horas.....	132
Figura 3.8: Perfiles mecánicos de las películas de almidón, quitosano MPM y compuestas. A: Perfil de ensayos de tensión uniaxial DMA; B: Perfil de ensayos de tracción con texturómetro. La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.....	137

Figura 3.9: Parámetros de color en películas compuestas. A: parámetros de cromaticidad $a^*$ y $b^*$ ; B: Luminosidad; C: Diferencias de color $\Delta E$ . La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1...	140
Figura 3.10: Espectro de absorbancia de películas de un solo componente y películas compuestas. La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.....	142
Figura 3.11: Curvas de resistencia del termosellado [F máxima (N) vs deformación (mm)] y modo de falla en películas compuestas. A: Perfil mecánico para películas con fallas en el material y ruptura junto al sellado; B: Perfil mecánico para películas con falla adhesiva del cierre.....	146
Figura 3.12: Secuencia fotográfica mostrando la falla adhesiva en películas compuestas. A: sello íntegro a tiempo inicial; B: el sello empieza a romperse durante el ensayo; C: ruptura total del sello.....	147
Figura 3.13: Envase flexible (bolsa) obtenido con las películas compuestas termoselladas.....	149

#### Capítulo 4

Figura 4.1: Ficha técnica del extracto de semillas de pomelo utilizado.....	162
Figura 4.2: Obtención de emulsiones a través de dos etapas de homogeneización (primaria y secundaria).....	166
Figura 4.3: Esquema de homogeneizador de alta velocidad y sistema de vacío adaptado al Ultraturax. ....	166
Figura 4.4: Esquema de una emulsión termodinámicamente inestable.....	167
Figura 4.5: Procesos de desestabilización de emulsiones.....	168
Figura 4.6: Evolución del cremado de una emulsión O/W.....	169
Figura 4.7: Esquema de funcionamiento del Turbiscan. ....	170
Figura 4.8: Determinación de la tensión superficial de una SFF con anillo de Du Noüy. ....	171
Figura 4.9: Recta de calibración de Limoneno.....	181
Figura 4.10: Cromatograma de aceite esencial de limón. ....	182
Figura 4.11: Espectro FTIR-ATR de aceite esencial de limón.....	183

Figura 4.12: Cromatograma de extracto de semillas de pomelo obtenido por HPLC a 330nm así como la deconvolución de los picos presentes y los tiempos de retención asignados. ....	183
Figura 4.13: Espectro FTIR-ATR de extracto de semillas de pomelo. ....	184
Figura 4.14: Distribución del tamaño de partículas de suspensión formadora de film con 3% de AEL y sin tensioactivos. ....	186
Figura 4.15: Suspensiones formadoras de film (SFFs) conteniendo: A) 3% de extracto de semillas de pomelo, ESP; y B) 3% de aceite esencial de limón, AEL. ....	187
Figura 4.16: Perfiles de $\square$ BS vs altura del tubo (mm) obtenidos con Turbiscan durante 7 días para SFFs con extracto de semillas de pomelo y emulsionantes. A: ESP 0.1T; B: ESP 0.1ST (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80). ....	188
Figura 4.17: Variación del Backscattering ( $\Delta$ BS, %) en función del tiempo de almacenamiento para SFFs con extracto de semillas de pomelo sin tensioactivos y con 0.1% de tensioactivos (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80). ....	188
Figura 4.18: Perfiles de Delta de Backscattering ( $\square$ BS) en función de la altura del tubo obtenidos con Turbiscan durante 7 d para emulsiones con aceite esencial de limón. A: AEL 0.1T; B: AEL 0.1ST; C: AEL 0.2T; D: AEL 0.2ST (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80). ....	190
Figura 4.19: $\% \Delta$ BS en función del tiempo de almacenamiento para SFFs con 3% de aceite esencial de limón sin tensioactivos y con 0.1 y 0.2% de tensioactivos (T: tween 80; ST: mezcla span80 y tween80). ....	190
Figura 4.20: Viscosidad aparente a $100 \text{ s}^{-1}$ de las SFFs obtenidas a partir de diferentes formulaciones. ....	192
Figura 4.21: Fotografías de películas activas. a: AM:Q; b: ESP1 y ESP3; c: AEL1 y AEL3. ....	193
Figura 4.22: Micrográficas electrónicas de barrido de películas activas. A: AM:Q; B: ESP1; C: ESP3; D: AEL1; E: AEL3. ....	196
Figura 4.23: Curvas termogravimétricas TG (A) y su primera derivada DTG (B) para películas compuestas activas. ....	200
Figura 4.24: Termograma de película compuesta de almidón y quitosano (AM:Q) y temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). ....	201

Figura 4.25: Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de diferentes componentes (A) y de películas compuestas de almidón y quitosano (B).....	203
Figura 4.26: Análisis de componentes principales de los dos componentes principales (CP1 y CP2) de películas con 1 y 3% de compuestos activos (AEL o ESP).....	205

## Capítulo 5

Figura 5.1: Separación de película biodegradable de almidón:quitosano (AM:Q) del molde de 10x15 cm <sup>2</sup> . .....	219
Figura 5.2: Procedimiento de envasado de arándanos frescos en películas activas. ...	221
Figura 5.3: Determinación de resistencia a la punción de arándanos frescos. ....	223
Figura 5.4: Perfil de comportamiento mecánico típico y parámetros para arándanos obtenido mediante ensayo de punción (Adaptado de Zapata y col., 2010). .....	223
Figura 5.5: Determinación de tasa respiratoria estacionaria en arándanos.....	224
Figura 5.6: Preparación de muestras para la observación de hongos filamentosos....	228
Figura 5.7: Inoculación de arándanos en el pedúnculo con suspensión de esporos de <i>Botrytis cinérea</i> . .....	229
Figura 5.8: Envasado de arándanos inoculados en películas biodegradables.....	230
Figura 5.9: Contenido de sólidos solubles y acidez en arándanos var. Misty durante almacenamiento refrigerado envasados en <i>clamshell</i> (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3). .....	231
Figura 5.10: Contenido de sólidos solubles y acidez en arándanos var. Emerald durante almacenamiento 30d refrigerado y 7d a temperatura ambiente envasados en <i>clamshell</i> (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3). .....	232
Figura 5.11: Pérdidas de peso para arándanos var. Misty durante 24 d en almacenamiento refrigerado envasados en <i>clamshell</i> (CL), películas	

biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).....	234
Figura 5.12: Pérdidas de peso para arándanos var. Emerald durante 30 d de almacenamiento refrigerado y 7 d a temperatura ambiente envasados en <i>clamshell</i> (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).....	235
Figura 5.13: Evolución de la fuerza máxima durante la conservación de arándanos var. Misty envasados en <i>clamshell</i> (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).....	236
Figura 5.14: Evolución de la fuerza máxima durante la conservación de arándanos var. Emerald envasados en <i>clamshell</i> (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).....	237
Figura 5.15: Evolución de los parámetros de color L, a* y b* de arándanos var. Misty conservados 24 d en refrigeración envasados en <i>clamshell</i> (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).....	242
Figura 5.16: Evolución de los parámetros de color superficial L, a* y b* de arándanos var. Emerald conservados 30d a 1°C y 7d a 20°C envasados en <i>clamshell</i> (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).....	243
Figura 5.17: Incidencia de mohos en arándanos var. Misty durante su conservación en refrigeración envasados en <i>clamshell</i> (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas	

biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).....	245
Figura 5.18: Incidencia de mohos en arándanos var. Emerald durante su conservación 30d en refrigeración y 7d a temperatura ambiente envasados en <i>clamshell</i> (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).....	246
Figura 5.19: <i>Alternaria spp.</i> en arándanos. A: desarrollo en la fruta, B: conidios del moho. ....	247
Figura 5.20: <i>Botrytis cinerea</i> en arándano. A: fruto con moho gris; B: detalle de conidióforo.....	247
Figura 5.21: <i>Colletotrichum acutatum</i> en arándano. A: moho en fruta; B: conidios. ....	248
Figura 5.22: Fotografías de arándanos inoculados y envasados en A: <i>clamshells</i> (CL); B: películas activas AEL3; C: películas activas ESP3; D: película biodegradable AM:Q.....	250
 <b>Anexos</b>	
Figura A.1: Ensayo de determinación de la concentración mínima inhibitoria para extracto de semillas de pomelo contra <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i> .....	265

## Resumen

La aplicación de nuevas tecnologías para la conservación postcosecha de arándanos tiene un relevante interés regional, ya que el cultivo de esta fruta en la región del NEA representa un 40% de la producción nacional (aprox. 17 mil Tn). Este volumen de fruta fresca se destina en su mayor parte al mercado de exportación, encontrándose que las principales causas de pérdidas de calidad de la fruta en los países de destino están asociadas a podredumbres producidas por mohos. Para subsanar este problema, una alternativa natural y sustentable, es utilizar envases biodegradables formulados con componentes activos. Algunos de estos componentes son biopolímeros y compuestos naturales que se obtienen a partir de los residuos generados de la pesca, la agricultura o la ganadería. Desde un punto de vista medio ambiental, el aprovechamiento de residuos resulta de gran interés puesto que se consigue obtener un rendimiento y valorizar estos desechos, reducir su cantidad y por lo tanto los costos y problemas de su eliminación. El quitosano (derivado n-acetilado de la quitina) es un producto que proviene de residuos de la industria pesquera que tiene propiedades antimicrobianas y posee la capacidad de formar películas al igual que el almidón proveniente de maíz, siendo ambos polisacáridos biodegradables y químicamente compatibles. Asimismo para el desarrollo de materiales que adapten sus propiedades, especialmente las mecánicas, a las necesidades de los envases, se incorporan plastificantes siendo los polialcoholes ampliamente utilizados con este fin. Las matrices pueden ser funcionalizadas por agregado de aditivos específicos. Al respecto, a partir de subproductos de la industria citrícola pueden obtenerse diversos compuestos activos con capacidad antimicrobiana y antioxidante, los que resultan de particular interés en el desarrollo de envases para la conservación de frutas mínimamente procesadas.

En el presente trabajo de Tesis doctoral se desarrollaron y caracterizaron envases biodegradables activos para preservar la calidad de arándanos almacenados en condiciones de refrigeración. Se utilizó una matriz compuesta de biopolímeros (almidón y quitosano) como base de las formulaciones para obtener las películas biodegradables. Se caracterizaron los polisacáridos de partida, ya que se trabajó con tres tipos de quitosano de distinto peso molecular. Se estudiaron las mezclas de ambos biopolímeros en distintas proporciones de almidón:quitosano, con el fin de seleccionar la formulación que conduce a películas con propiedades de barrera y mecánicas óptimas. Como agente plastificante se empleó glicerol y, como componentes con actividad antimicrobiana, se incorporó aceite esencial de limón o extracto de semillas de pomelo.

La metodología utilizada para analizar las dispersiones formadoras de películas fue mediante ensayos rotacionales y dinámicos con un reómetro Rheo Stress 600 ThermoHaake (Haake, Alemania) utilizando una geometría plato-plato. En el caso de las formulaciones que incluían los compuestos activos, las películas activas se obtenían a partir de emulsiones, cuya estabilidad se evaluó mediante ensayos en un Turbiscan classic (Formulation, Francia) y a través del estudio del tamaño de gota de las emulsiones (Mastersizer 2000, Malvern, Inglaterra). Posteriormente se realizó la caracterización de las películas obtenidas evaluando la microestructura, las propiedades físicoquímicas, ópticas, mecánicas y de barrera, así como la capacidad antimicrobiana y antioxidante.

Las propiedades de las películas que se determinaron fueron: humedad, mediante secado en estufa a 105°C; espesor con medidor de espesores para sustancias no ferrosas Check Line DCN-900 (New York, USA); solubilidad en agua a 25°C; permeabilidad al vapor de agua según Norma ASTM E-96, usando copas de permeación Payme Elcometer 5100 (Manchester, Reino Unido); propiedades mecánicas de tracción y de punción con texturómetro TA.XT2i- Stable Micro Systems (Inglaterra); análisis cuasiestático uniaxial DMA en un equipo Q800 (TA Instruments (New Castle, EUA) con un sistema de refrigeración de N<sub>2</sub> líquido; permeabilidad al oxígeno en un equipo Mocon OX-TRAN modelo 2/21 ML (Lippke, Neuwied, Alemania); propiedades térmicas en una termobalanza TGA 1 Stare System (Mettler-Toledo, Inc., Suiza). El análisis térmico se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido en un DSC 1 Stare System (Mettler-Toledo, Inc., Suiza). Con el fin de estudiar la compatibilidad entre los componentes de las matrices se determinaron los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, EEUU). Las propiedades ópticas se evaluaron a través de la medida del color superficial de las películas con un colorímetro triestímulo (CR-300 Minolta, Japón) en el espacio de color CIELAB; la capacidad de barrera al UV-Visible con un espectrofotómetro U-1900 (HITACHI, Japón). El estudio de la microestructura de las matrices desarrolladas se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JEOL JSM-6300 (Japón). La actividad antioxidante de las películas activas se evaluó determinando la capacidad antioxidante equivalente del Trolox (TEAC) mientras que la capacidad antimicrobiana se estudió mediante ensayos de halo de inhibición de dos mohos (*Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*) y algunas bacterias Gram+ y Gram- (*Listeria innocua* y *Escherichia coli*).

La etapa final comprende ensayos, bajo refrigeración, de arándanos envasados en los materiales diseñados para evaluar el efecto de los mismos sobre los principales atributos de calidad comercial. A tal fin se determinaron el porcentaje de deshidratación mediante pérdida de peso, color superficial con colorímetro triestímulo, porcentaje de deterioro visualmente y firmeza de la fruta mediante ensayo de punción con el texturómetro mencionado anteriormente. Asimismo se determinó la capacidad antimicrobiana frente a los mohos *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* mediante inoculación artificial.

Las dispersiones formuladas con los dos biopolímeros (almidón de maíz y quitosano) presentaron comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ) y una viscosidad aparente intermedia a las viscosidades de las películas de un solo componente. Luego del moldeo y secado de las suspensiones, se obtuvieron películas, las que se pudieron separar fácilmente de las placas. La coloración de las películas obtenidas fue levemente amarillenta (parámetro de cromaticidad  $b^*$  positivo) atribuida a la reacción de Maillard entre grupos amino e hidroxilo del quitosano.

En el estudio de las micrográficas SEM de las películas compuestas se observó que las secciones transversales de las mismas eran homogéneas y densas; los cambios evidenciados en los espectros de FTIR demostraron que ambos polímeros son compatibles y que entre ellos se establecen enlaces electrostáticos débiles del tipo puentes de hidrógeno. Esta característica permitió explicar las mejoras observadas en las propiedades



de las películas compuestas comparadas con las de las películas de los polímeros individuales.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas dependió del peso molecular del quitosano empleado, siendo menor cuanto mayor es el PM del quitosano. Asimismo, se observó un efecto sinérgico en las películas compuestas. La solubilidad de los films en agua tuvo una tendencia similar a la PVA. Con respecto a los ensayos de tracción, en general, las películas desarrolladas plastificadas exhibieron un perfil de tensión-deformación típico de los materiales poliméricos dúctiles. El comportamiento mecánico de las películas de quitosano también se vio afectado por su PM. Mientras que las películas formuladas con quitosano APM fueron frágiles y rígidas, debido a que mostraban altos valores de módulo de elasticidad y de resistencia a la tracción y bajos valores de elongación a la ruptura, las formuladas con MPM y BPM resultaron extremadamente deformables y flexibles.

Cuando se incorporaron los agentes activos en la formulación de las películas, en las micrografías SEM se observó una matriz homogénea en los films con extracto de semillas de pomelo, mientras que en los films con aceite esencial de limón se observó la separación de la fase oleosa. Se demostró la capacidad antimicrobiana de los materiales desarrollados.

Si bien la pérdida de peso de los arándanos envasados fue similar a la fruta control, los demás atributos de calidad resultaron aceptables. En los ensayos antimicrobianos in vitro e in vivo con fruta fresca, se encontró que hubo control del crecimiento fúngico con el uso de películas, siendo más efectiva la formulación con extracto de semillas de pomelo.

Fue posible obtener materiales compuestos a partir de hidrocoloides, biopolímeros y sus mezclas con aditivos específicos.

Los materiales compuestos obtenidos son biodegradables ya que se degradan en suelo a corto plazo y tienen adecuadas propiedades de resistencia mecánica y a la humedad.

Se diseñaron y obtuvieron envases a partir de los materiales formulados que permitieron preservar la calidad de arándanos con la ventaja de su bajo impacto ambiental, permeabilidad selectiva a gases y capacidad antimicrobiana.

## Abstract

The application of new technologies for blueberries postharvest conservation has a relevant regional interest, since in the NEA region the fruit farming represents 40% of the national production (approximately 17 thousand Tn). This volume of fresh fruit is destined principally to exports, being the main causes of the loss of fruit's quality in the countries of destination the spoilage by molds. To solve this problem, a natural and sustainable alternative, is using biodegradable packaging formulated with active components. Some of these components are biopolymers and natural compounds obtained from the waste generated from fishing, agriculture or livestock. From an environmental point of view, the use of waste results in a great interest that can obtain a yield and valorize these wastes, reduce their quantity and therefore the costs and problems of their elimination. Chitosan (n-acetylated derivative of chitin) is a by-product of the fishing industry; it has antimicrobial properties and film forming capacity like maize from corn, being both biodegradable and chemically compatible polysaccharides. For the development of materials that adapt their properties, especially the mechanical ones, to the needs of the containers, plasticizers are incorporated, being the polyalcohols, used for this purpose. The matrices can be functionalized by the addition of specific additives. In this regard, some by-products of the citrus industry present antimicrobial and antioxidant capacity, which offer a particular interest in the development of packaging for the conservation of minimally processed fruits.

In present thesis active biodegradable containers were developed and characterized to preserve the quality of blueberries stored under refrigeration conditions. A matrix composed of biopolymers (starch and chitosan) was used as the base of the formulations to obtain the biodegradable films. Both polysaccharides were characterized, since three types of chitosan of different molecular weight were used. The mixtures of both biopolymers in different proportions of starch:chitosan were studied, in order to select the formulation that leads to films with optimal barrier and mechanical properties. As the plasticizing agent, glycerol was used and, as components with antimicrobial activity, lemon essential oil or grapefruit seed extract were incorporated.

Rotational and dynamic tests were performed to study film-forming dispersions with a Rheo Stress 600 ThermoHaake rheometer (Haake, Germany) using a parallel-plate geometry. In the case of the formulations that included the active compounds, the active films were obtained from emulsions, whose stability was evaluated by light dispersion test in Turbiscan classic (Formulacion, France) and by droplet size analysis in Mastersizer 2000 (Malvern, England). Subsequently, the characterization of the films obtained was evaluated by microstructure, physicochemical, optical, mechanical and barrier properties, as well as the antimicrobial and antioxidant capacity.

The films properties analyzed were: humidity, by drying in an oven at 105 °C; thickness with thickness gauge for non-ferrous substances Check Line DCN-900 (New York, USA); solubility in water at 25 °C; water vapor permeability according to ASTM E-96, using Payme Elcometer 5100 permeation cups (Manchester, United Kingdom);

mechanical tensile and puncture properties with texturometer TA.XT2i- Stable Micro Systems (England); quasi-static uni-axial DMA analysis in a Q800 equipment (TA Instruments (New Castle, USA) with a liquid N<sub>2</sub> refrigeration system; oxygen permeability in a Mocon OX-TRAN model 2/21 ML equipment (Lippke, Neuwied, Germany); Thermobalances in a TGA 1 Stare System thermobalance (Mettler-Toledo, Inc., Switzerland) The thermal analysis was performed by differential scanning calorimetry in a DSC 1 Stare System (Mettler-Toledo, Inc., Switzerland). In order to study the compatibility between the matrix components, the Fourier transform infrared (FTIR) spectra were determined in a spectrophotometer (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, USA). The optical properties were evaluated by measuring the surface color of the films with a tristimulus colorimeter (CR-300 Minolta, Japan) in the CIELAB color space; UV-Visible barrier capacity with a U-1900 spectrophotometer (HITACHI, Japan). The study of the microstructure of the developed matrices was carried out through scanning electron microscopy (SEM) in a JEOL JSM-6300 microscope (Japan).

The antioxidant activity of the active films was evaluated by determining the equivalent antioxidant capacity of Trolox (TEAC), while the antimicrobial capacity was studied by inhibition halo assays of two molds (*Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*) and some Gram + and Gram – bacteria (*Listeria innocua* and *Escherichia coli*).

The final stage tests, under refrigeration, of blueberries packed were performed and the main attributes of commercial quality were evaluated. For this purpose, the percentage of dehydration was determined by weight loss, surface color with tristimulus colorimeter, percentage of visual deterioration and firmness of the fruit by puncture test with the aforementioned texturometer. Likewise, the antimicrobial capacity against the molds *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* was determined by artificial inoculation.

The two-biopolymer dispersions showed pseudoplastic behavior ( $n < 1$ ) and an apparent viscosity intermediate to the viscosities of the single-component films. After the molding and drying of the suspensions, films were obtained, which could be easily separated from the plates. The color of the obtained films was slightly yellowish (parameter of chromaticity  $b^*$  positive) attributed to the Maillard reaction between amino and hydroxyl groups of chitosan.

In the SEM micrographs of composite films it was observed that the cross sections were homogeneous and dense; the changes evidenced in the FTIR spectra showed that both polymers are compatible and linked through weak electrostatic (hydrogen bond type) bonds. This behavior allowed to explain the improvement properties in composite films compared with the one-polymers.

The water vapor permeability (WVP) of the films depended on the chitosan molecular weight, being lower the greater the MW of the chitosan. Also, a synergistic effect was observed in the composite films. The films solubility in water had a similar tendency to

WVP. Concerning to tensile tests, in general, the developed plasticized films exhibited a typical tension-strain profile of the ductile polymeric materials. The mechanical behavior of the chitosan films was also affected by their MW. While the films formulated with chitosan HMW were fragile and rigid, because they showed high values of elastic modulus and tensile strength and low values of elongation at break, those formulated with MMW and LMW were extremely deformable and flexible.

When active agents were incorporated in films formulations, in the SEM micrographs a homogeneous matrix was observed in the films with grapefruit seed extract, while in the films with lemon essential oil the separation of the oil phase was observed. The antimicrobial capacity of the developed materials was demonstrated. Although the weight loss of the packaged blueberries was similar to the control fruit, the other quality attributes were acceptable. In the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial tests with fresh fruit, the use of films allow to control the fungal growth, being more effective the grapefruit seed extract formulation. It was possible to obtain composite materials from hydrocolloids, biopolymers and their mixtures with specific additives.

The composite materials obtained are biodegradable since they degrade in soil in the short term and they have adequate properties of mechanical resistance and moisture. Containers from the formulated materials were designed and obtained, and they allowed to preserve the blueberries quality with the advantage of its low environmental impact, selective gas permeability and antimicrobial capacity.

# I. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

## I. Introducción General

### I.1 Arándanos

#### I.1.1 Generalidades: Características y Propiedades

El arándano es el fruto de un arbusto perenne nativo del Hemisferio Norte, perteneciente a la familia de las Ericáceas y al género *Vaccinium*. Está comprendido dentro del grupo de frutas finas, el cual se encuentra clasificado comercialmente en berries (frutilla, arándano, frambuesa, grosella, mora) y cherries (guinda y cereza) (Bruzzone, 2007). En nuestro país, las variedades plantadas son las *Southern Highbush*, que se caracterizan por su bajo requerimiento de horas de frío.

Los arándanos son frutos climatéricos, es decir, que continúan con su proceso de maduración luego de ser cosechados de la planta y una vez que alcanzaron la madurez fisiológica. Cuando se alcanza esta última, continúan ocurriendo cambios en el color, sabor y firmeza en la fruta, lo cual se conoce como madurez organoléptica. Posteriormente, ocurre rápidamente su deterioro y se manifiestan características indeseables tales como ablandamiento, pérdida de sabor y de color. Son frutas susceptibles a la pérdida de agua, lo cual conduce al encogimiento de la fruta y a la pérdida del brillo de la piel (Chiabrando & Giacalone, 2011).

La fruta se caracteriza por una baja producción de etileno (0.1 a 1.0 mg/kg h a 5°C). La vida útil, es decir, el período durante el cual la fruta mantiene sus cualidades e integridad es relativamente corto; en condiciones óptimas de conservación la vida promedio poscosecha es de 10 a 18 días (Cantwell, 2001; Mitcham & Mitchell, 2007).

Las condiciones de conservación que generalmente se emplean son -0.5 a 1°C de temperatura, 90 a 95% de humedad relativa y atmósfera controlada con 2 a 5% de O<sub>2</sub> y 12 a 20% de CO<sub>2</sub> (Leyte & Forney, 1999a, b; Cantwell, 2001; Gorris & Peppelenbos, 2003; Kader, 2007).

Constituye una fuente de fibras y pectinas, y se destaca por su alta concentración de vitamina C. También posee antocianinas (92 mg/kg) y otros compuestos fenólicos que le brindan la coloración azul característica y le confieren propiedades antioxidantes (Azevedo y col., 2010; Fu y col., 2011). Su campo de aplicación es amplio y se destaca su empleo en el área de la medicina, por su mencionada propiedad antioxidante; es vaso-protector y antiséptico urinario. También se emplea en la industria de los colorantes, ya que representa

uno de los pocos pigmentos naturales de coloración azul; y, por supuesto, en la industria de alimentos, en donde es un ingrediente en productos de pastelería, conservas, yogures, golosinas, entre otros productos.

### **I.1.2 Producción**

En los últimos 10 años, la producción mundial de arándanos promedió 553000 toneladas en una superficie media de 68000 hectáreas (FAO, 2016).

A nivel mundial, los principales productores y comercializadores son Estados Unidos y Canadá, ambos con una amplia porción del mercado, 56% y 32% respectivamente. En tercer lugar, se encuentra Polonia con un 3% del mercado. El resto de los productores abarcan una porción del mercado menor al 1.5% (entre ellos, se encuentran Alemania, Países Bajos, Lituania, Méjico, Chile, Argentina, etc.).

En nuestro país, las principales provincias productoras son Entre Ríos, Tucumán y Buenos Aires, en las cuales se concentra más del 90% de la superficie total implantada (Craviotti, 2012a). También existen plantaciones de menor relevancia en Córdoba, Corrientes, Salta, San Luis y Santa Fe. En todas estas provincias las variedades cultivadas son las *Southern Highbush*. En la Patagonia (Río Negro y Chubut), se realizaron plantaciones pequeñas de *Northern Highbush* (*V. corymbosum*), que presentan alto requerimiento de horas de frío (Rivadeneira & Kirschbaum, 2012).

De acuerdo al Censo Nacional Agropecuario (INDEC, 2007), en 2002, la superficie implantada era de apenas 322.7 hectáreas, alcanzando las 4000 ha en 2008 (Craviotti 2012b).

Actualmente, la superficie total plantada en Argentina se estima en 2600 ha aproximadamente, y su distribución se puede observar en la Figura I.1 (Rivadeneira, 2016). La Región de Salto Grande, que comprende todas las plantaciones en suelos arenosos de la provincia de Entre Ríos, consta de 1360 ha plantadas.

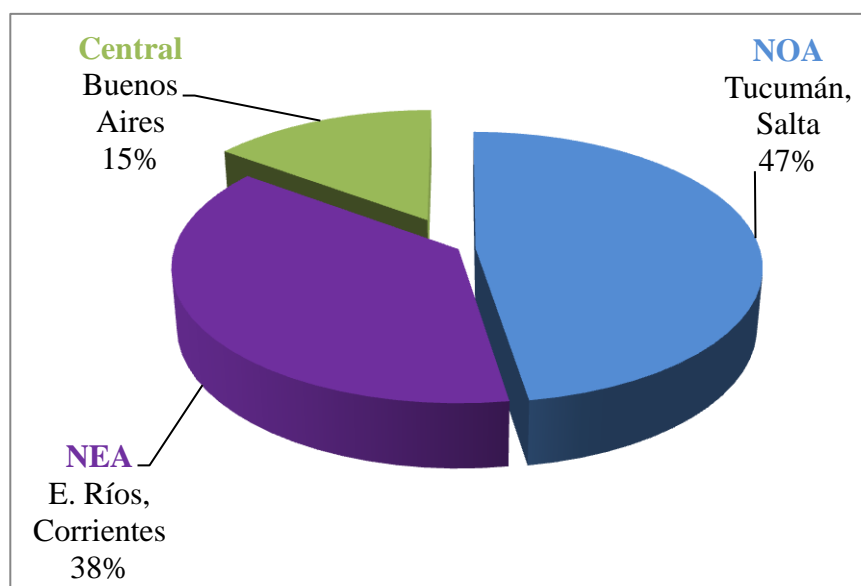


Figura I.1: Distribución porcentual de área implantada en Argentina.

Las plantaciones más antiguas se encuentran en Buenos Aires (realizadas en la década del 90); en Entre Ríos, los primeros cultivos se realizaron en 1998, y en Tucumán en el año 2002. Se considera que nuestra provincia, al poseer condiciones agroclimáticas más ventajosas (suelo, agua, clima, entre otros), se ha convertido en la principal zona de producción del país.

En la Figura I.2, se puede observar la evolución de la superficie destinada a este cultivo en nuestro país (Rivadeneira, 2016).

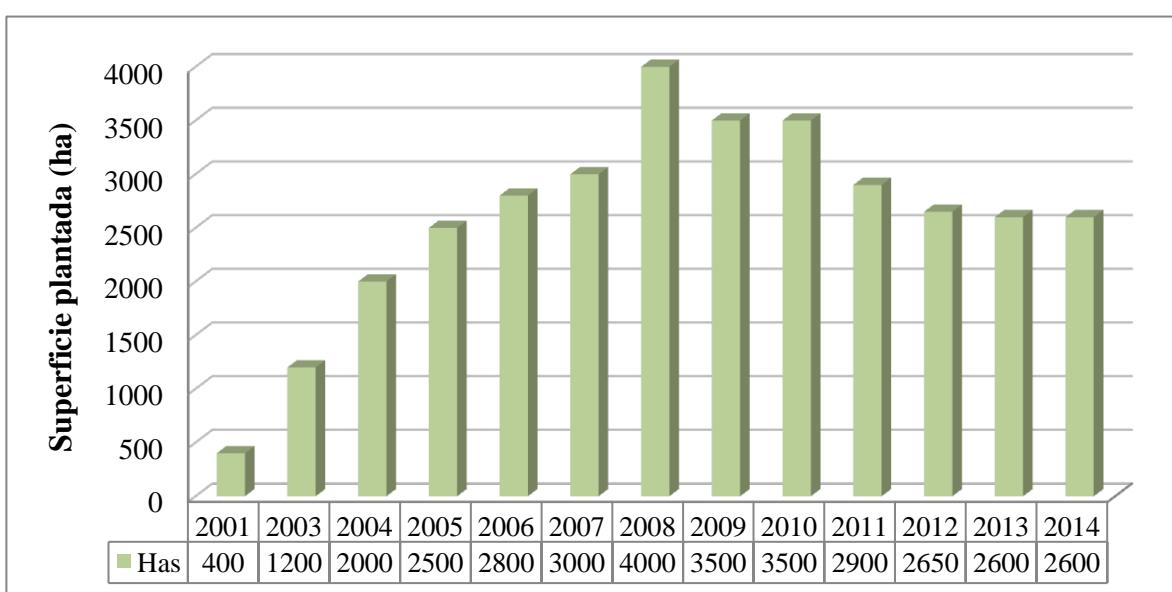


Figura I.2: Evolución de la superficie implantada en Argentina.



Esta tendencia creciente, que se observa en el aumento de la superficie implantada y en el aumento de la producción, se explica por un incremento de los precios en el mercado fresco y un incremento de la demanda mundial del arándano (Bañados, 2009).

### **I.1.3 Cultivo**

El rendimiento del cultivo, es decir, la producción por unidad de superficie depende de la edad del cultivo. Durante los primeros 3 años de vida, las plantas no producen prácticamente fruta (940 kg/ha en el tercer año). El pico de producción se da a partir del noveno año, en el cual se obtienen aprox. 11800 kg/ha (INTA, 2015).

La densidad de plantación con la que se trabaja habitualmente en los campos, corresponde a 3300 plantas por hectárea.

Las variedades plantadas en Concordia, así como en Tucumán, son principalmente O'Neal (52%) y Misty (27%); en menor medida se encuentran otras variedades tales como Emerald (9%), Jewel (6%), Star (6%) y Bluecrisp (1%); también existen otras variedades en cantidades menos significativas (Georgiagem, Sharpblue, Gulfcoast, Springhigh, Biloxi, Primadonna, Snowchaser y Abundance).

### **I.1.4 Mercado y Comercialización**

El mercado del arándano es netamente de exportación de la fruta fresca. Las ventas al exterior constituyen el 90% de la producción, siendo el principal destino de la producción EEUU y Europa (Argentinean blueberry committee, 2017). Allí, el período de producción abarca los meses de mayo a octubre, por lo que los países productores del hemisferio sur (Chile y Argentina), poseen las condiciones necesarias para abastecer a los mercados mencionados en los períodos de escasez (exportación en contraestación). Las exportaciones de la zafra 07/08 se valoraron en 66 millones de dólares (Rivadeneira & Kirschbaum, 2012), lo que ubica al arándano en el sexto lugar del ranking de las frutas que generaron mayor valor exportado en nuestro país. El resto de la producción se consume en el mercado local o se destina a la industria.

Este sector presenta un dinamismo permanente. El crecimiento del sector fue muy pronunciado durante los primeros diez años, presentando un crecimiento del 83% anual en

volumen exportado. En la zafra 2007/8 el aumento registrado fue del 33% respecto al período anterior. Luego se observa una desaceleración que se debe fundamentalmente a la incidencia de aspectos climáticos (heladas tardías en Concordia) y de insectos, tales como *trips*. Durante este período también se detectó un aumento en los volúmenes de fruta destinados a otros usos; en primer lugar, se observó esta tendencia en la fruta congelada y comercializada de esta forma en el interior y exterior del país. También se incrementó el volumen destinado a la elaboración de jugos concentrados.

A partir de la campaña 2012 y hasta los registros disponibles de 2015 la superficie sembrada se estabilizó en 1000 ha, con rendimientos dependientes de las condiciones agroclimáticas imperantes (Rivadeneira, 2016).

La forma de comercialización habitual es la venta de la fruta envasada en la propia quinta o la de fruta a granel, en la cual el envasado se realiza en empaques de empresas exportadoras o de terceros que prestan el servicio.

Existen varias presentaciones de fruta envasada dependiendo de las necesidades y requisitos de los clientes; comúnmente el empaque se realiza en cajas de 1.5 kg, que a su vez contienen 12 *clamshells* o cestillas plásticas de polietilentereftalato (PET) con un contenido neto de 125 gr cada una. También pueden encontrarse envases más grandes de 1.8, 2, 3.2 y 4 kg, que contienen envases pequeños de 150, 170, 400 y 500 gr.

En la cadena de valor se ven involucrados varios actores, siendo los protagonistas los productores y las empresas exportadoras. También participan otras empresas que abastecen o sirven de apoyo con diversas actividades; entre ellos, se encuentran los viveros, servicios de plantación, provisión e instalación de equipos de riego, asesoramiento técnico, servicio de cosecha, empaque, frío y fumigación.

### **I.1.5 Alteraciones de los arándanos**

Los arándanos presentan un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo de hongos: alto contenido de nutrientes, alta actividad acuosa y valores de pH ácidos (Almenar y col., 2007). Por esto, el ataque fúngico y de insectos son la principal causa de deterioro pre y poscosecha (Ellis y col., 2004; Ellis & Nita, 2008).

A nivel mundial, las podredumbres más significativas encontradas son: podredumbre por *Alternaria*, generada por *Alternaria tenuissima* (Wright y col., 2004; Luan y col., 2007; Wright y col., 2008a, b; Rivera y col., 2009), podredumbre gris por *Botrytis cinerea* (Cappellini y col., 1983; Lambert, 1990; Smith y col., 1996; Smith, 1998; Tournas & Katsoudas, 2005; Vásquez y col., 2007; Wright y col., 2008a, b; Rivera y col., 2009), y antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* (Hartung y col., 1981; Daykin & Milholland, 1984; Lambert, 1990; Smith y col., 1996; Guerber & Correll, 1997; Wright y col., 1998, 2008a; Barrau y col., 2001; Polashock y col., 2005; Verma y col., 2006, 2007; Yoshida y col., 2007; Wharton & Schilder, 2008; Rivera y col., 2009).

En Argentina, los principales agentes responsables del deterioro del arándano en el cultivo han sido identificados como *Alternaria tenuissima* (Wright y col., 2004, 2008a, b; Rivera y col., 2009); *Botrytis cinerea* (Vásquez y col., 2007; Wright y col., 2008a, b; Rivera y col., 2009); *Dothichiza caroliniana* (Baino y col., 2007); *Pucciniastrum vaccinii* (Dal Bello & Perelló, 1998; Wright y col., 2008b; Rivera y col., 2009); *Pestalotiopsis guepini* (Wright y col., 1998, 2008b; Rivera y col., 2009); *Colletotrichum gloeosporioides* (Wright y col., 1998, 2008a; Rivera y col., 2009).

### **I.1.5.1 Podredumbre por *Alternaria***

Es una de las enfermedades que más comúnmente aparecen en los frutos. El agente causante del deterioro es *Alternaria tenuissima*. Su crecimiento produce manchas rojizas foliares variables en forma y tamaño. Pueden aparecer en la parte superior o inferior de las hojas, y pueden llegar a abarcar toda la superficie. En los tallos, aparecen canchales. En los frutos se producen manchas oscuras, reblandecimiento y hundimiento de la fruta cerca del cáliz (Velázquez y col., 2010). En la superficie dañada aparecen esporas negro grisáceas, como se observa en la Figura I.3.

Para evitar el desarrollo de la enfermedad, la fruta se debe refrigerar rápidamente luego de su cosecha, bajo condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas.

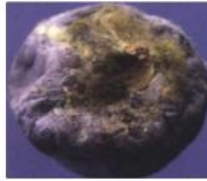


Figura I.3: Alteración debida a *Alternaria tenuissima*.

### **I.1.5.2 Podredumbre gris**

Este tipo de deterioro es producido por *Botrytis cinerea*. Este hongo produce la aparición de manchas irregulares y pardas, atacando las partes jóvenes de los tallos, hojas y frutas. También provoca atizonamiento de los brotes, necrosis y marchitez en hojas y flores y pudrición de frutos (Rivera y col., 2009) (Figura I.4).

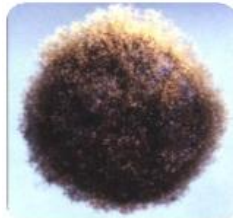





Figura I.4: Podredumbre gris en arándano.

### **I.1.5.3 Otras alteraciones**

También se han encontrado otros agentes causantes de deterioro, los cuales se han resumido en la tabla I.1.

Tabla I.1: Otros tipos de deterioros en arándanos.

Enfermedad	Agente	Síntomas	Apariencia
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum acutatum</i>	En los frutos, estos microorganismos generan pudriciones blandas, con tonalidad levemente bronceada y exudados color marrón. También atacan flores y hojas.	 <p data-bbox="1166 736 1321 824"><b>Figura I.5:</b> Antracnosis</p>
Roya	<i>Pucciniastrum vaccinii</i>	Puede afectar el rendimiento, por producir defoliación. Genera manchas foliares cloróticas, que luego se tornan necróticas. En las frutas, produce la aparición de manchas pústulas rojizas alrededor del cáliz.	 <p data-bbox="1129 1146 1355 1182"><b>Figura I.6:</b> Roya</p>
Momificación	<i>Molininia vaccinii-corymbosi</i>	Genera atizamiento de brotes y hojas y produce manchas color café en la nervadura central. También aparecen esporas de color grisáceas. Los frutos maduros aparecen momificados, grises, duros, arrugados y suelen caer prematuramente.	 <p data-bbox="1150 1534 1337 1621"><b>Figura I.7:</b> Momificación</p>

### I.1.6 Tratamientos poscosecha

Todos los procesos poscosecha que se realizan buscan preservar la calidad de la fruta, manteniendo sus características y propiedades naturales.

En el empaque dedicado a la exportación, se realiza en primer lugar la clasificación por tamaño, selección manual y envasado, de acuerdo a los parámetros establecidos por el mercado internacional.

La sala de empaque se encuentra separada de la zona de recepción por una cortina sanitaria de cloruro de polivinilo (PVC) para evitar la contaminación cruzada entre los sectores.

La fruta se vuelca en la línea de empaque en la cinta transportadora inicial. Desde allí se distribuye a las distintas líneas de clasificación. En estas líneas, se encuentran las clasificadoras mecánicas que constan de burletes plásticos que permiten eliminar las frutas pequeñas que son descartadas y destinadas a industria, ya que no son comercializables en el mercado internacional. El resto de la fruta, continúa a las mesas de selección, en las cuales el personal entrenado quita la fruta con algún defecto visual.

Los frutos que se encuentran en buenas condiciones continúan hacia una segunda clasificadora mecánica de tamaño, que los separa de acuerdo a su diámetro en tres categorías (chico, mediano y grande). Las clasificadoras se ajustan de acuerdo a las especificaciones de los clientes y a la variedad de arándano.

Luego, se encuentran las envasadoras mecánicas que pesan la fruta y la envasan dentro de los contenedores plásticos llamados *clamshells* o cestillas de PET. Éstos se agrupan manualmente y se colocan en cajas de cartón corrugado más grandes, las que se colocan en pallets y se llevan a refrigeración a una temperatura de 10°C hasta su despacho.

La refrigeración debe realizarse durante las primeras cuatro horas de realizada la cosecha, para evitar pérdidas por deterioro. El sistema más comúnmente utilizado para bajar la temperatura de los arándanos es en cámara frigorífica equipada con forzadores de aire, que permiten reducir la temperatura más rápidamente al hacer pasar el aire frío a través de la fruta. Este sistema con aire forzado logra bajar la temperatura de la pulpa desde 20 ó 25°C hasta 1,5°C en 2 hs; en cambio, en una cámara frigorífica convencional se requieren 48 hs (Hernández Hernández, 2014).

La temperatura óptima de conservación, para reducir al mínimo las pérdidas poscosecha, se encuentra entre -0.5 y 0°C (Cantwell, 2001; Mitcham & Mitchell, 2007). A estas temperaturas, se reduce la tasa respiratoria de la fruta y, en consecuencia, se retrasa el metabolismo y el comienzo de la senescencia, lo que permite prolongar la vida útil poscosecha de los arándanos.

Sumado al control de la temperatura, se utilizan atmósferas modificadas durante el transporte y almacenamiento. El empleo de CO<sub>2</sub> en una concentración de 15 a 20% y de O<sub>2</sub> al 5 a 10% en el aire, disminuye la proliferación de *Botrytis cinerea* y de otros microorganismos, además reduce la tasa respiratoria de la fruta y el ablandamiento, por lo que se prolonga la vida útil de la fruta (Kader, 2007; Mitcham & Mitchell, 2007; Almenar y col., 2007).

El bromurado es otro tratamiento poscosecha que se realiza en la fruta destinada a EEUU. Consiste en la fumigación de los pallets ya consolidados con bromuro de metilo durante 3,5 horas manteniendo la temperatura de la pulpa a 21°C. Posteriormente, se realiza la aireación y el enfriamiento hasta 0,5 – 1°C. Para mantener las temperaturas durante el transporte, se colocan geles y/o mantas térmicas, y se cierra el pallet (Zapata y col., 2013). Este tratamiento se emplea para el control de plagas cuarentenarias, como *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*, conocidas como mosca de la fruta, (Molina y col., 2010).

## **I.2 Envases**

### **I.2.1 Generalidades**

En términos generales, un envase es un recipiente o contenedor que tiene contacto directo o indirecto con el producto. Además, un envase específico para alimentos debe cumplir ciertas funciones, como contener al alimento, protegerlo, informar al consumidor (mediante la identificación), facilitar la manipulación, entre otras.

Una clasificación primaria permite discriminar a los materiales existentes y en vías de desarrollo según su origen, ya sea renovable o no renovable, y según su biodegradabilidad (Tabla I.2).

Tabla I.2: Clasificación de los materiales de envases.

	Biodegradable	No biodegradable
Origen renovable	Polisacáricos (almidón, quitosano, alginato, carragenatos, pectina), Proteínas (colágeno, gelatina, zeína, gluten de trigo)	Polietileno “verde” obtenido a partir de caña de azúcar (Braskem)
Origen no renovable	Poliésteres sintéticos (Polibutilensuccinato-PBS, polibutilenadipatotereftalato-PBAT)	Polímeros convencionales (PET, PP, PE)

Una clasificación más exhaustiva de los polímeros biodegradables de acuerdo a su origen, se puede observar en las Figuras I.5 y I.6.

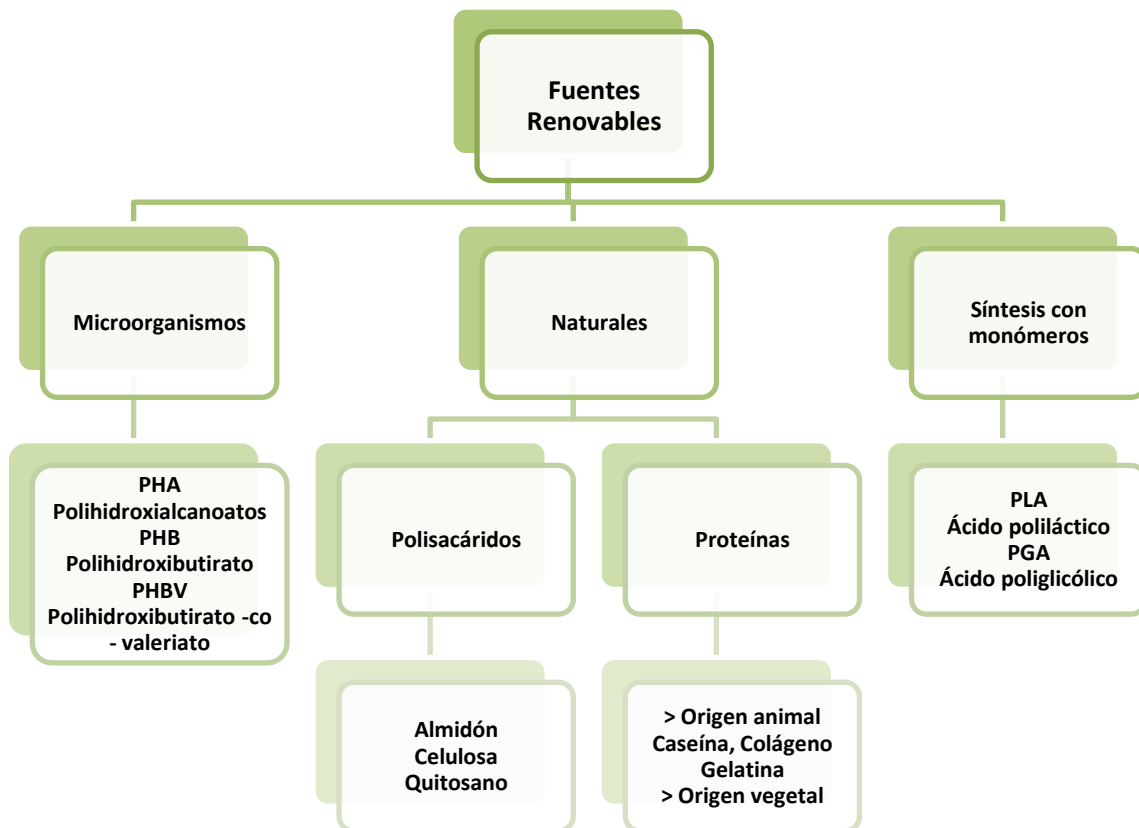


Figura I.5: Materiales Biodegradables obtenidos a partir de fuentes renovables.



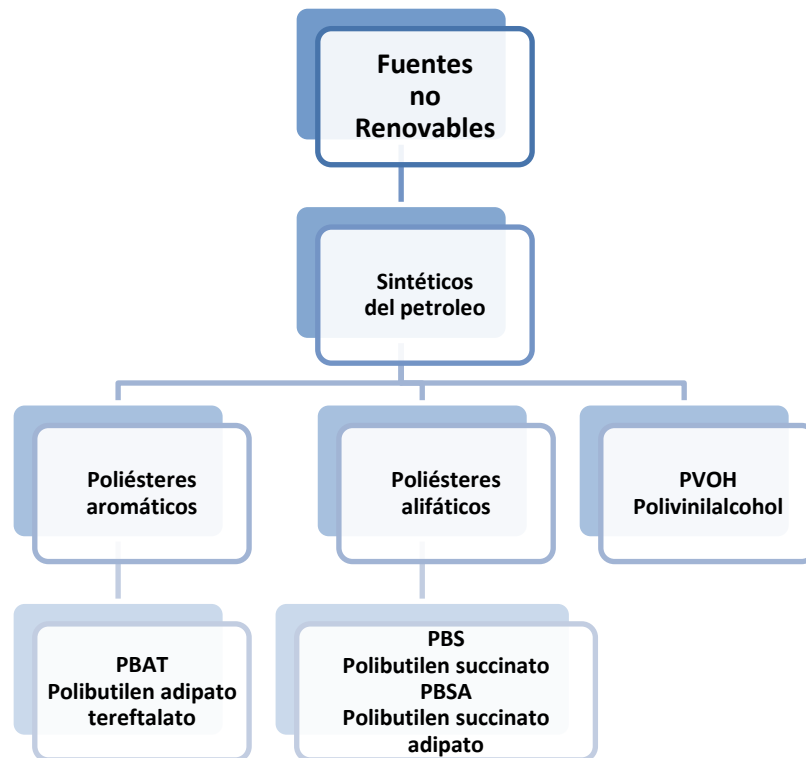


Figura I.6: Materiales Biodegradables obtenidos a partir de fuentes no renovables.

Los materiales biodegradables también pueden ser compostables, esto significa que durante su degradación biológica, se produce compost o fertilizante orgánico, debido a la acción de las bacterias del suelo.

### **I.2.2 Tendencias en el uso de envases**

Si bien existen materiales provenientes de fuentes renovables y que poseen la característica de ser biodegradables, más del 95% de los envases que se usan en la industria alimenticia son derivados del petróleo.

Es por esto, que las tendencias hacia el uso y consumo de productos ecológicos obtenidos a partir de materiales renovables, impulsan la búsqueda de nuevas tecnologías junto con el desarrollo de nuevos productos. Este interés y esta tendencia se deben a la preocupación creciente por la escasez de los recursos naturales, tales como las reservas de petróleo, y el impacto ambiental causado por el uso de envases plásticos no biodegradables.

Los últimos años se han realizado numerosas investigaciones para la obtención de envases (películas y recubrimientos), también llamados bioenvases, formulados a partir polímeros naturales renovables y su aplicación en el área de alimentos.

Estos materiales tienen la propiedad de ser biodegradables, es decir, que poseen la capacidad intrínseca para ser degradados mediante la acción de microorganismos.

Algunas de las ventajas inherentes al uso de materiales biodegradables son las siguientes:

- Reducción de la disposición o producción de residuos plásticos tradicionales que requieren ser incinerados para su eliminación o reciclados para su posterior uso.
- Menor consumo energético necesario para la producción de estos materiales.
- Reducción de emisión de gases del efecto invernadero.

Como contrapartida, estos productos continúan superando en costo a los derivados del petróleo (son de 1.5 a 3 veces más costosos) y presentan en general menores propiedades mecánicas y susceptibilidad al agua.

### **I.2.3 Generación y degradación de residuos plásticos**

En nuestro país se generan actualmente 36000 tn de residuos sólidos urbanos por día y, en promedio, la generación per cápita es de 0.85 kg/hab/día (Fundación ambiente y recursos naturales FARN, 2012). En la Ciudad de Buenos Aires, este valor asciende a 1.23 kg/hab/día, por lo que se trata del mayor productor de residuos del país; mientras que en la provincia de Misiones la generación per cápita es tan sólo de 0.44 kg/hab/día.

Los residuos urbanos pueden clasificarse según su fuente tal como se muestra en la Figura I.7. De acuerdo a esta clasificación, se puede destacar que los residuos plásticos constituyen el 14% del total de desechos generados, que a su vez pueden clasificarse en plásticos rígidos (60%) y flexibles (40%) (Organización Mundial de Packaging WPO, 2009).

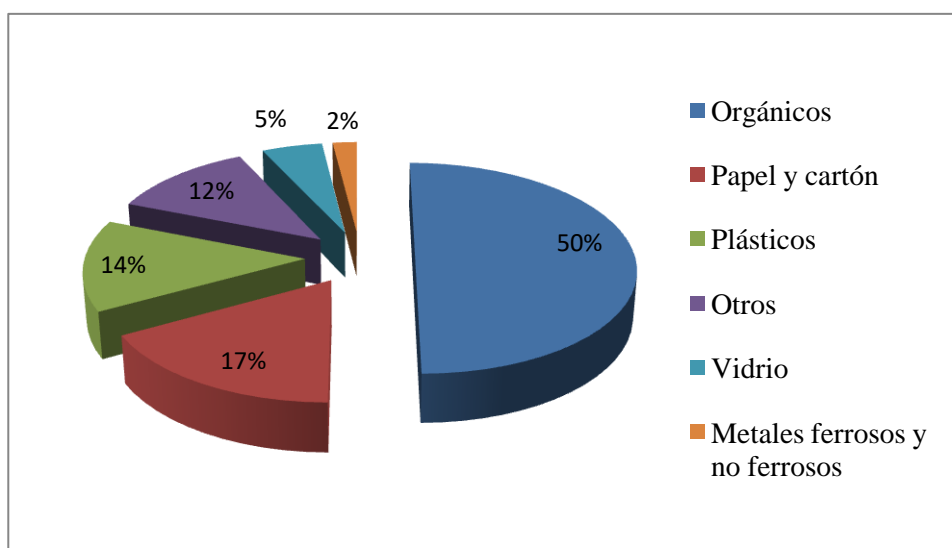


Figura I.7: Clasificación de residuos urbanos.

Dentro de la categoría plásticos se incluye todo tipo de materiales de origen sintético, siendo uno de sus usos principales el envasado de alimentos.

Si se tiene en cuenta el tiempo que tardan en degradarse naturalmente (abandonados a la intemperie) estos productos, se puede decir que las botellas plásticas, fabricadas principalmente de PET, tardan entre 100 y 1000 años en desintegrarse completamente; dejadas al aire libre pierden su tonicidad, se fragmentan y dispersan; en cambio, si son enterradas en el suelo, permanecen más tiempo intactas ya que la mayoría de los microorganismos no tienen mecanismos para degradarlas. Por otra parte, las bolsas plásticas, al tener menor espesor que las botellas, se pueden transformar más rápidamente. La mayor parte de las bolsas que se utilizan habitualmente están hechas de polietileno de baja densidad (LDPE), que en promedio tardan 150 años en degradarse.

### **I.3 Películas y recubrimientos biodegradables**

Las películas y los recubrimientos son sistemas en general multicomponentes formados por una capa delgada de material que actúan como barrera ante determinados agentes, tales como vapor de agua, oxígeno, humedad entre otros (Figura I.11) cuando se los utiliza como envases de alimentos. Estas propiedades de barrera a los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) y al vapor de agua resultan muy importantes, ya que las pérdidas de calidad de los productos

alimenticios se vinculan principalmente a procesos metabólicos de respiración y transpiración.

Adicionalmente las películas pueden ser comestibles, para lo cual deben estar formuladas a partir de materias primas adecuadas para el consumo (GRAS).

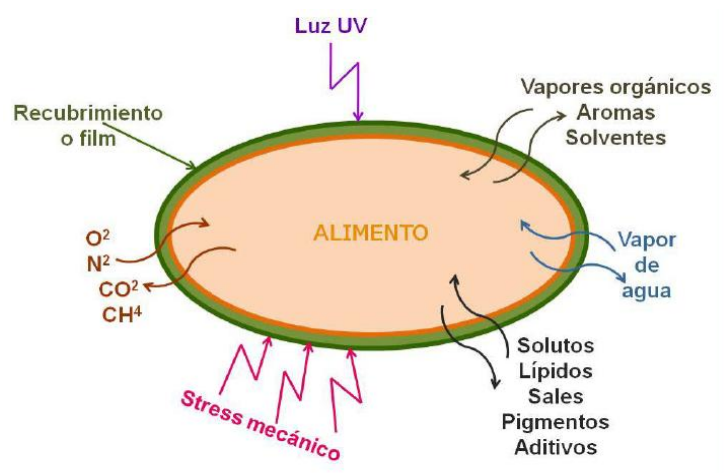


Figura I.8: Transferencias que ocurren en los alimentos.

Adaptado de Rodríguez García (2016).

La diferencia esencial entre películas y recubrimientos, radica en que las primeras se obtienen independientemente y pueden ser manipuladas en forma separada del alimento; en cambio, los recubrimientos involucran una etapa de formación de la estructura directamente en la superficie del alimento que se pretende proteger. Los recubrimientos forman parte del producto y permanecen en el mismo durante su uso y consumo (Krochta & De Mulder-Johnston, 1997), siendo en este caso imprescindible el uso de componentes GRAS (generalmente reconocidos como seguros) en las formulaciones.

Como ya se mencionó, las investigaciones y el desarrollo de envases biodegradables y comestibles han comenzado hace unos años atrás y continúa con creciente intensidad debido a diversos intereses. Por un lado, los consumidores buscan alimentos más saludables y de mejor calidad; y por otra parte, hay una tendencia creciente en la sociedad/población de generar menos contaminación en el planeta (existe una concientización social sobre el cuidado del medioambiente; esto es, la reducción de la generación contaminación a través del uso de productos amigables con el medioambiente).

Una funcionalidad importante y distintiva de los recubrimientos y películas es su capacidad para incorporar ingredientes activos, ya que pueden servir como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad del producto. Es posible utilizarlos, por ejemplo, en el envasado de frutas frescas mínimamente procesadas para mejorar su calidad y vida útil con la incorporación de antioxidantes, antimicrobianos, mejoradores de textura.

### **I.3.1 Componentes**

#### **I.3.1.1 Hidrocoloides**

Los hidrocoloides son compuestos hidrofílicos de origen vegetal, animal o microbiano. Su denominación se debe a que son solubles o dispersables en agua, y el grupo comprende a los polisacáridos y algunas proteínas.

Las películas de hidrocoloides pueden ser utilizadas en las aplicaciones en donde no sea prioritario el control de la migración de vapor de agua. Estas películas poseen buenas propiedades de barrera al oxígeno, al dióxido de carbono y a lípidos. En general, estos films poseen propiedades mecánicas adecuadas lo que los hace fácilmente manipulables. También presentan buena solubilidad en agua por lo que pueden ser útiles especialmente cuando se utilicen con productos que deban ser calentados antes de su consumo.

Las películas obtenidas a partir de hidrocoloides pueden ser clasificadas de acuerdo a su composición, carga molecular y solubilidad en agua. Pueden obtenerse tanto a partir de carbohidratos - como almidones (nativos o modificados) y gomas (alginatos, pectinas, goma arábiga y exopolisacáridos como el kefirán y gelano entre otros)- como de proteínas (incluyendo gelatina, caseína, proteína de suero, y proteínas de trigo y de maíz).

##### **I.3.1.1.1 Almidón de maíz**

El almidón es uno de los polisacáridos naturales más abundantes. Es una fuente renovable, económica y ampliamente disponible (Lourdin, 1995). Los almidones nativos y modificados se utilizan en la industria de los alimentos para lograr determinadas características físicas en los productos alimenticios, tales como salsas, sopas y productos cárnicos, modificando principalmente la textura, viscosidad, adhesión, retención de humedad, formación de gel, etc.

Los almidones nativos están compuestos por dos principales macromoléculas: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de  $\alpha$ -1,4 glucosa y tiene una excelente capacidad para formar film (Campos, 2011). Por otra parte, la amilopectina es un polímero altamente ramificado de cadenas cortas de  $\alpha$ -1,4 unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 que aparecen cada 25-30 unidades de glucosa. Ambas macromoléculas se encuentran formando gránulos que contienen regiones cristalinas y no cristalinas. La mayoría de los almidones nativos presentan una estructura semicristalina, en la cual la amilosa y los puntos ramificados de la amilopectina forman regiones amorfas; mientras que las cadenas cortas ramificadas de la amilopectina son los componentes principales de la región cristalina de los gránulos de almidón. Por lo tanto, cuanto mayor sea el contenido de amilopectina en el almidón nativo, mayor será la cristalinidad. La relación amilosa/amilopectina depende de la fuente botánica del almidón. Generalmente, los almidones contienen entre 20 y 25% de amilosa y 70 a 80% de amilopectina (Brown & Poon, 2005); esto es así para los almidones provenientes del trigo, maíz y papa (Liu, 2005). La presencia de fuertes enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas, hace que los gránulos de almidón no sean solubles en agua fría. Durante el calentamiento en agua, se rompe la estructura cristalina de los gránulos y el agua interactúa con los grupos hidroxilo de la amilosa y amilopectina, produciendo la solubilización parcial del almidón. Si se continúa calentando en presencia de un exceso de agua, a temperaturas entre 65 y 100°C, se produce un proceso irreversible de gelatinización. Durante este proceso de desestructuración, se producen cambios irreversibles, como la pérdida de la cristalinidad, absorción de agua, hinchamiento de los gránulos (Zhong y col., 2009). Este proceso es necesario que se produzca, ya que las películas de almidón se obtienen a partir de sus suspensiones acuosas gelatinizadas. El proceso ocurre en dos etapas; primero ocurre una hidratación y difusión del agua dentro de los gránulos de almidón, y luego, ocurre una fusión de los cristales.

Durante la formación de la película, ambas macromoléculas se reacomodan y las fracciones lineales de amilosa y amilopectina se reasocian mediante puentes de hidrógeno. La cristalinidad de las películas depende de las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa), así como del contenido de plastificante (Rindlav y col., 1997). La presencia de las fuerzas atractivas entre las moléculas puede producir fragilidad

en la película; por ello, el agregado de plastificantes, usualmente polilcoholes, se incorporan en las dispersiones para disminuir las fuerzas intermoleculares. El plastificante actúa en la región amorfa donde hay mayor movilidad de las moléculas. Su eficacia depende del tipo de plastificante y de su cantidad. La principal ventaja del uso de plastificantes consiste en que las películas se vuelven más flexibles, el esfuerzo de tensión (TS) disminuye y la deformación a la ruptura (%EB) aumenta (Sothornvit & Krotcha, 2001). Sin embargo, provocan efectos indeseados como el aumento de la permeabilidad al vapor de agua, al oxígeno y a los componentes aromáticos.

El plastificante debe ser compatible con la matriz polimérica. Por ello, el glicerol es uno de los componentes más utilizados.

En general, los aditivos y el resto de los componentes que se incorporen en la formulación para obtener las películas activas, deben prepararse independientemente y agregarse a las suspensiones de almidón luego de la gelatinización.

### **I.3.1.1.1 Proceso de obtención de películas biodegradables de almidón**

Uno de los principales problemas que aparecen cuando se reemplazan polímeros sintéticos por naturales, es la dificultad en la adaptación de los procesos de obtención de películas a escala industrial.

Existen dos metodologías para la preparación y obtención de películas: un método denominado húmedo y otro seco. El primero de ellos (Proceso húmedo), conocido como casting, es más comúnmente aplicado en investigación pero involucra tiempos de secado extensos. En cambio, el método seco, que consiste en un tratamiento termoplástico del material, no presenta este inconveniente.

Proceso húmedo:

El método consiste en el moldeo de las suspensiones o soluciones filmogénicas y su posterior deshidratación mediante el secado generalmente en estufa a baja temperatura. La incorporación de lípidos en la formulación, que mejora las propiedades de barrera al vapor de agua del material, requiere una etapa de homogenización para obtener una buena emulsión. Se han obtenido emulsiones estables de aceite de girasol y almidón de maíz

utilizando un homogeneizador de alta velocidad (García y col., 2000); también en mezclas de ácidos grasos – glicerol y almidón de maíz se obtienen emulsiones estables y una buena integración de todos los componentes (Jiménez y col., 2012).

En la obtención de sistemas compuestos, cuando se trabajan con diferentes hidrocoloides, se requiere un paso de mezcla para obtener las dispersiones formadoras de film. Al respecto, Vásconez y col. (2009) trabajaron con mezclas de almidón de mandioca y quitosano, para obtener un material con propiedades antimicrobianas. Para ello, prepararon ambos polisacáridos separadamente y luego, en una etapa posterior, los mezclaron con un homogeneizador de rotor-estator.

Esta etapa de homogenización genera comúnmente la formación de burbujas de aire en las dispersiones. Cuando esto ocurre, se suelen utilizar sistemas de vacío (Famá y col., 2006; Talja y col., 2008) para remover las burbujas, que podrían provocar microporos y defectos en las películas finales.

Luego de las etapas de gelatinización y homogenización, las dispersiones deben verterse en los moldes (generalmente de acrílico o teflón) y secarse en condiciones controladas. Algunos autores obtuvieron películas de almidón utilizando placas de Petri de polietileno (García y col., 2000; Osés y col., 2009) o de poliestireno (Paes y col., 2008).

El secado de la dispersión es una etapa crítica para lograr eliminar el exceso de agua y hacer más fácilmente manejables las películas. Las condiciones de secado varían ampliamente en la literatura. Así, Rodríguez y col. (2006) utilizaron una cámara climatizada a 60°C y 60% de HR mientras que Bergo y col. (2008) obtuvieron películas de almidón de mandioca mediante secado a 30°C durante 18 a 24 hs.

No existe un método estándar para la preparación de películas de almidón y obtener las características funcionales y fisicoquímicas que se requieren para una aplicación determinada. El proceso de preparación depende de numerosos factores, como el tipo de almidón y plastificante, y debe ser optimizado para lograr películas con propiedades adecuadas.

### Proceso seco:

El almidón nativo no es un material termoplástico, pero puede ser procesado al igual que los polímeros sintéticos si es tratado apropiadamente. La gelatinización del almidón se



logra a bajos contenidos de humedad debido a las condiciones de alta cizalla y altas presiones que rompen los gránulos y permiten la entrada rápida del agua dentro de las moléculas de almidón. El proceso térmico también produce distintos cambios químicos y físicos en los gránulos, tales como difusión de agua, expansión del gránulo, gelatinización, descomposición, fusión y cristalización. Este tipo de procesamiento permite el escalado industrial utilizando el equipamiento que habitualmente se utiliza con los polímeros sintéticos.

### **I.3.1.1.1.2 Propiedades de las películas de almidón**

El almidón es uno de los polímeros más utilizados para obtener películas biodegradables debido a su capacidad de formar una matriz continua, su baja permeabilidad al oxígeno (Liu, 2005), y su bajo costo. Estas películas son transparentes, inodoras, insípidas e incoloras. Por otra parte, presentan carácter hidrofílico y pobres propiedades mecánicas. Otra propiedad importante es que tienen la característica de ser termosellables, característica que resulta indispensable para la obtención de envases flexibles.

### **I.3.1.1.2 Quitosano**

La quitina es un polímero natural abundante que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos (Kurita, 2006; Rabea y col., 2003), en la pared celular de hongos (Pochanavanich & Suntornsuk, 2002; Streit y col., 2009; Zamani y col., 2007) y otros materiales biológicos (Ai y col., 2008; Nemtsev y col., 2004; Song y col., 2013). Está compuesta principalmente por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-acetoamida-D-glucosa.

El quitosano es un polímero derivado de la quitina, que se obtiene por desacetilación parcial de ésta última en un medio alcalino. Por lo tanto, el quitosano es un copolímero, es decir, una macromolécula formada por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-acetoamida-D-glucosa y  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucosa; generalmente las unidades con el grupo amino se encuentran en proporción mayor al 60% respecto de las unidades acetiladas.

El quitosano se describe esencialmente en función de su peso molecular y su grado de desacetilación (es decir, proporción de grupos aminos), ya que las propiedades antimicrobianas, la cationicidad y la capacidad de formación de película, están estrechamente vinculadas a esas características del polímero.

Las películas obtenidas a partir de quitosano presentan permeabilidad selectiva a los gases, tales como CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, las películas presentan la desventaja de ser permeables al vapor de agua, lo cual constituye una limitación a la hora de controlar la transferencia de humedad desde ambientes húmedos hacia el alimento. Por esta razón se han empleado aditivos en búsqueda del aumento de la hidrofobicidad y consecuente disminución de la permeabilidad obteniéndose buenos resultados con la incorporación de lípidos neutros, ceras (Morillon y col., 2002; Rhim, 2004) y arcilla (Xu y col., 2005), aunque estos aditivos comprometen las características mecánicas y la estabilidad química de las películas.

Las propiedades antifúngicas y antimicrobianas intrínsecas del quitosano se derivan de su naturaleza policationica. Su modo de acción se atribuye a la formación de fuerzas electrostáticas entre los grupos amino protonados del quitosano y los residuos negativos de la superficie de las células (Tsai y col., 2002). El número de grupos aminos protonados aumenta a medida que aumenta el grado de desacetilación (DD) del quitosano, así como también su actividad antimicrobiana. Según Liu y col. (2004), la acción bactericida del quitosano se debe a la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosano y los grupos fosforilo de los fosfolípidos que se encuentran en las paredes celulares de los microorganismos. Otros autores afirman que al pH neutro de las células, las moléculas de quitosano se vuelven insolubles, con lo cual precipitan en la superficie de las células microbianas y forman una capa que impide el transporte de solutos esenciales para la vida a través de las membranas (Qin y col., 2006).

El quitosano tiene un particular interés para la fabricación de películas debido a su propiedad de ser un agente antimicrobiano eficaz (No y col., 2007); aunque su modo de acción se cree que se produce por contacto directo (Escárcega-Galaz y col., 2018).

### **I.3.1.2 Lípidos**

Los lípidos se caracterizan por ser hidrofóbicos y no poliméricos. Al contrario de los hidrocoloides, los lípidos son buenas barreras a la humedad. Dentro de este grupo se encuentran las ceras, resinas, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos. Generalmente, no se emplean solos porque no poseen suficiente integridad estructural para formar películas y recubrimientos.

### I.3.1.3 Películas compuestas

Las propiedades funcionales de las películas de quitosano pueden mejorarse a través de la combinación de este polímero con otros hidrocoloides (Vargas y col., 2011; Park y col., 2001) y con lípidos. Se ha encontrado que las películas compuestas formuladas a partir de mezclas de quitosano y almidón de maíz presentan menor permeabilidad al vapor de agua, que las películas obtenidas sólo con quitosano (Xu y col., 2005).

En el caso de los sistemas compuestos que incluyan lípidos en su formulación, según la ubicación de los lípidos respecto a los hidrocoloides, las películas y recubrimientos compuestos pueden ser del tipo laminados o bicapa u obtenerse a partir de emulsiones.

En los materiales laminados, los lípidos se encuentran en bicapa, es decir, formando una capa lipídica sobre una capa de hidrocoloides. En este tipo de películas, la distribución de los lípidos es homogénea por lo que existe un control satisfactorio de la transferencia de agua (Parzanese, 2010) (Figura I.9).

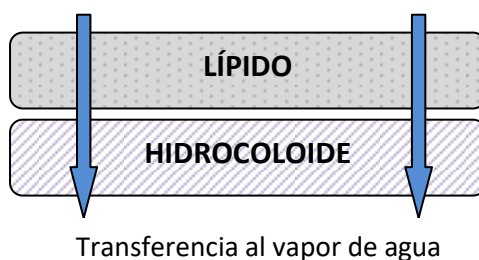


Figura I.9: Modelo de película compuesta laminada

Las películas compuestas también pueden obtenerse a partir de emulsiones, es decir, mezclas heterogéneas de lípidos dentro de una matriz de hidrocoloides. En este tipo de películas, la distribución de lípidos no es tan homogénea como en el caso anterior, por lo que son menos eficientes para el control de la transferencia de humedad (Parzanese, 2010) (Figura I.10).

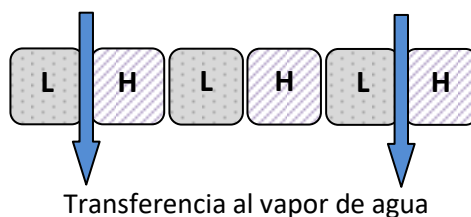


Figura I.10: Modelo de película compuesta obtenida a partir de una emulsión.

### **I.3.2 Aplicaciones de las películas biodegradables**

Las películas y los recubrimientos, por sí mismos o actuando como transportadores de aditivos tales como antioxidantes o antimicrobianos, han sido estudiados en la preservación de alimentos debido a su capacidad para extender la vida útil de los mismos (Sallam, 2007).

Bangyekan y col. (2006) obtuvieron películas de almidón de mandioca recubiertas con quitosano, y caracterizaron los materiales obtenidos determinando sus propiedades físicas. Estos autores obtuvieron mejoras en las propiedades mecánicas de las películas, en comparación con las que presentaron las películas de un solo componente. Las mejoras encontradas se pueden atribuir a la interacción entre las cadenas de almidón y quitosano.

Algunas de las aplicaciones de películas y recubrimientos estudiadas en el área de envasado de productos frescos mínimamente procesados se resumen en la Tabla I.3:

Tabla I.3: Aplicaciones de películas y recubrimientos en frutas y verduras frescas o mínimamente procesados.

Producto	Matriz polimérica	Función	Referencia
Mango	Quitosano	Reducir la pérdida de peso e inhibir el crecimiento de microorganismos	Chien y col., 2007a
Ciruela	Hidroxipropilcelulosa (HPC) + lípidos	Preservar la calidad poscosecha	Pérez-Gago y col., 2003
Fresas y Frambuesas	Quitosano	Reducir la pérdida de peso y deterioro de características sensoriales	Han y col., 2004
Pera	Carboximetilcelulosa (CMC) + aceite de soja + oleato sódico	Prolongar la vida útil	Togrul & Arslan, 2003b
Rodajas de Pitaya roja	Quitosano	Retardar la pérdida de agua e inhibir el crecimiento de microorganismos	Chien y col., 2007b
Zanahoria	Almidón + quitosano + glicerol	Inhibir el desarrollo de microorganismos	Durango y col., 2006
Arándanos	PLA	Prolongar la vida útil	Almenar y col., 2008

#### I.4 Justificación del tema

Como ya se mencionó, el desarrollo de materiales activos con propiedades para mejorar la vida útil y la seguridad de los alimentos envasados, sin comprometer el medio ambiente, es actualmente una de las actividades desafiantes de la investigación. La necesidad surge de considerar que los materiales poliméricos derivados de los recursos fósiles provocan un importante impacto ambiental, como son el efecto invernadero, el calentamiento global

(Koller y col., 2010) y el daño a la vida silvestre (Averous, 2004). Además los envases fabricados con estos materiales, que no son biodegradables, generan un problema ecológico grave debido a la acumulación de residuos. Por otra parte, la existencia de ciertas interacciones entre el material plástico del envase y el alimento que contiene genera ciertas restricciones de uso de algunos polímeros y sus aditivos para garantizar la protección del consumidor (Navia y col., 2014). Asimismo es importante destacar que desde la legislación se impulsa el uso de materiales eco-compatibles. Al respecto a nivel nacional la Ley N° 3.147 (publicada en el boletín oficial el 1 de febrero de 2018) tiene por objeto fomentar el desarrollo de la producción de bolsas biodegradables; la reducción progresiva y posterior prohibición en la entrega de bolsas no biodegradables por parte de los comercios; y la sustitución de sobres y bolsas no biodegradables por aquellos que sí lo son (Argentina ambiental, 2018).

En base a estas razones, resulta de interés mundial reemplazar los plásticos convencionales por polímeros con menor impacto ambiental, especialmente para aplicaciones en envases y embalajes. Existe cada vez más conciencia por parte de las industrias de la necesidad de promover nuevas técnicas de producción basadas en recursos renovables (Koller y col., 2010) y por ello el uso de polímeros más sustentables, como son los biopolímeros o los polímeros biodegradables, se presenta como una alternativa a los derivados del petróleo.

Las materias primas utilizadas en la producción de bioplásticos, provienen de la biomasa, principalmente de la agricultura o de subproductos derivados de la industria de alimentos. Una de las principales ventajas del uso de películas y recubrimientos biodegradables es que se pueden incorporar en la matriz polimérica varios ingredientes activos (tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutraceuticos, prebióticos, vitaminas), mejorando así la seguridad e incluso los atributos nutricionales del alimento (Rojas-Grau y col., 2009). A su vez, el aprovechamiento de subproductos de la industria local permite revalorizar y disminuir el daño ambiental que provoca la eliminación de los desechos. En este sentido, a partir de desechos de la industria citrícola, actividad económica por excelencia de la región, se pueden recuperar diversos compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidante, o que contribuyan al aroma y color de los alimentos a los que se incorporen, siendo en general compuestos de alto valor agregado.

Por otra parte, en la cadena de valor del arándano y en particular en el sector arandano de la región del NEA (el cual representa un 40% de la producción nacional), surge la necesidad de disminuir las pérdidas de calidad de los arándanos en los lugares de destino, asociadas principalmente a podredumbres producidas por mohos.

Considerando lo antedicho, uno de los desafíos de esta investigación fue desarrollar un material biodegradable activo para la elaboración de envases destinados a la conservación poscosecha de arándanos. Asimismo, en este trabajo se apunta a investigar las propiedades de los materiales biodegradables y la utilización de subproductos de la industria regional.

Por lo tanto el presente trabajo de investigación constituye una contribución no sólo al sector productivo, sino a las futuras generaciones, buscando remediar o disminuir el daño que le producimos al ambiente.

### **I.5 Planificación**

La presente Tesis está constituida por una introducción en la cual se presenta la situación del sector arandano y se hace una reseña bibliográfica y de la metodología y las características de las películas biodegradables.

En el Capítulo 1 se realiza la caracterización de los polímeros con capacidad filmogénica utilizados.

Luego, en el Capítulo 2 se desarrollan películas con cada biopolímero, así como con la mezcla de ellos en igual proporción, y se determinan las principales propiedades tanto de las suspensiones filmogénicas como de las películas obtenidas a partir de ellas.

En el Capítulo 3, se estudia el efecto de diferentes proporciones de biopolímeros sobre las propiedades de las suspensiones y las películas, seleccionando la óptima en base a sus propiedades y a un análisis preliminar de los costos involucrados en su producción.

Posteriormente, en el Capítulo 4, se incorporan componentes derivados de desechos de la industria citrícola, con actividad antimicrobiana, lo cual constituye el desarrollo de películas activas.

Finalmente, en el Capítulo 5, se realiza la aplicación de las películas en la elaboración de envases para la conservación de arándanos, determinando los principales atributos de calidad de los frutos.

Por último se presentan las conclusiones generales del trabajo de investigación.

En la Figura I.11 se presenta un esquema con las principales etapas de la Tesis.



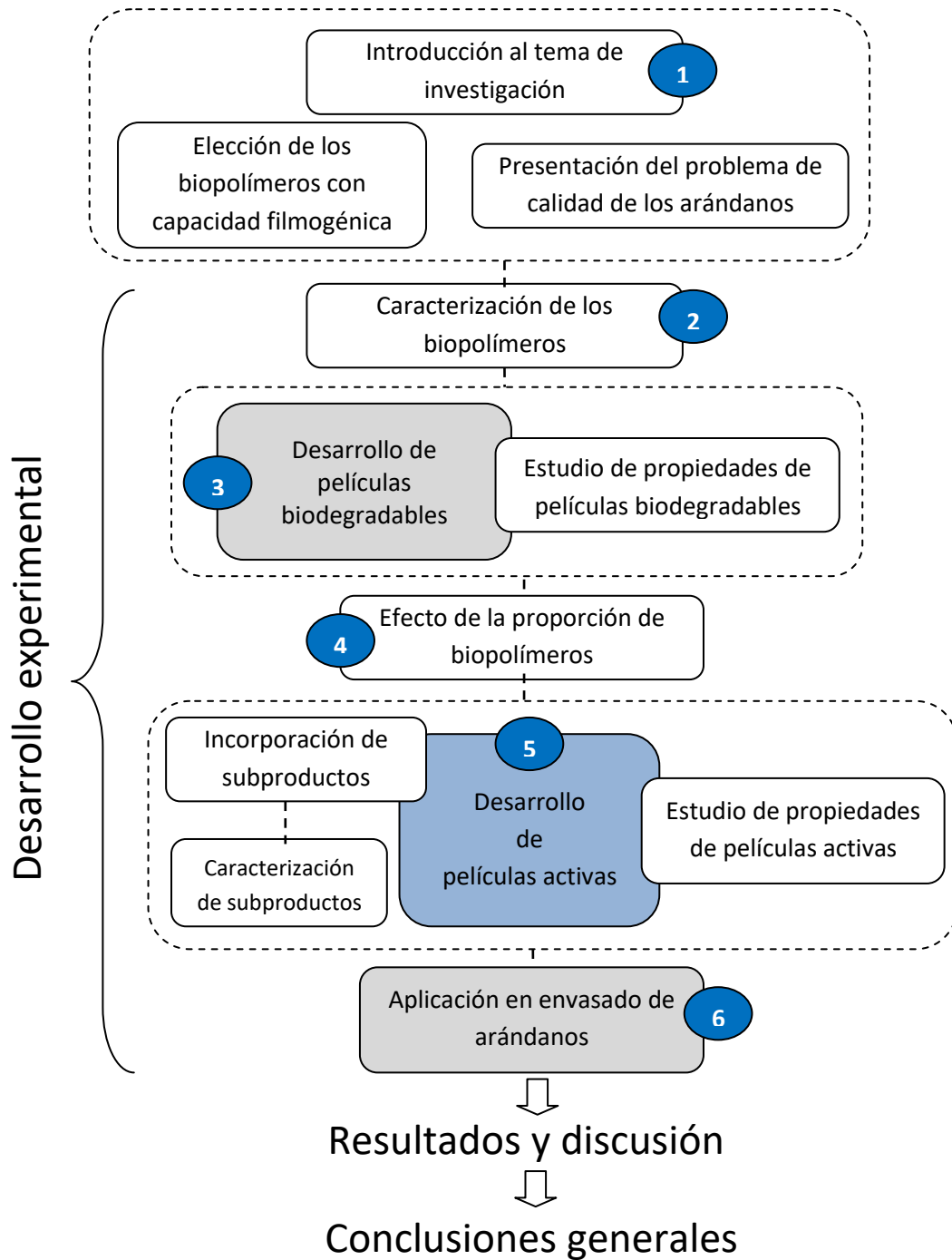


Figura I.11: Esquema de la planificación del trabajo de investigación.

## I.6 Referencias bibliográficas

- Ai, H., Wang, F., Yang, Q., Zhu, F. & Lei, C. (2008). Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. *Carbohydrate Polymers*, 72, 419–423.
- Almenar, E., Auras, R., Rubino, M. & Harte, B. (2007). A new technique to prevent the main post harvest diseases in berries during storage: Inclusion complexes  $\beta$ -cyclodextrin-hexanal. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 164-172.
- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., Harte, B. & Rubino, M. (2008). Postharvest shelf life extension of blueberries using a biodegradable package. *Food Chemistry*, 110, 120–127.
- Argentina ambiental (<http://argentinambiental.com/legislacion/ciudad-bs-aires/resolucion-2918-prohibicion-bolsas-plasticas/>); consultada el 1 de junio de 2018.
- Argentinean blueberry committee (2017). Weekly Crop Report 2017. Disponible online: <https://www.argblueberry.com/home/en/reportes/>. Consultado el 4/02/18.
- Averous, L. (2004). Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Journal of Macromolecular Science—Part C, Polymer Reviews*, C4(3), 231-274.
- Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., Freitas, V. D. & Mateus, N. (2010). Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry*, 119, 518-523.
- Baino, O., Ramallo, A.C., Hongn, S. & Ramallo, J.C. (2007). First Report of *Dothichiza caroliniana* Causing Double Spot on Highbush Blueberry in South America. *Plant Disease*, 91, 1685.
- Bangyekan, C., Aht-Ong, D. & Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 63, 61-71.
- Bañados, M.P. (2009). Expanding Blueberry Production into Non-Traditional Production Areas: Northern Chile and Argentina, Mexico and Spain. *Acta Horticulturae*, 810, 439-444.
- Barrau, C., De los Santos, B. & Romero, F. (2001). First Report of *Colletotrichum acutatum* in Blueberry Plants in Spain. *Plant Disease*, 85, 1285.
- Bergo, P.V.A., Carvalho, R.A., Sobral, P.J.A., Dos Santos, R.M.C., Da Silva, F.B.R., Prison, J.M., Solorza-Feria, J. & Habitante, A.M.Q.B. (2008). Physical properties of

- edible films based on cassava starch as affected by the plasticizer concentration. *Packaging Technology and Science*, 21(2), 85-89.
- Brown, W.H. & Poon, T. (2005). Introduction to Organic Chemistry (3rd ed.). Wiley, Londres. Pp. 324 – 341.
- Bruzzone, I. (2007). Cadenas Alimentarias – Frutas finas: berries. SAGPyA – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. *Alimentos Argentinos*, 39, 30-35. “[http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/economias\\_regionales/\\_frutas/\\_cadenas/Frutas\\_finas\\_berrie\\_11\\_07.htm](http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/economias_regionales/_frutas/_cadenas/Frutas_finas_berrie_11_07.htm)”. Consultada: 2014.
- Campos, C.A., Gerschenson, L.N. & Flores, S.K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875.
- Cantwell, M. (2001). Properties and recommended conditions for storage of fresh fruits and vegetables. University of California. “[http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/prop\\_b.shtml](http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/prop_b.shtml)”. Consultada: 2014.
- Cappellini, R.A., Ceponis, M.J. & Schulze Jr., C.P. (1983). The Influence of "Sweating" on Postharvest Decay of Blueberries. *Plant Disease*, 67, 381-382.
- Chiabrando, V. & Giacalone, G. (2011). Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-methyl-cyclopropene stored under air and controlled atmosphere. *Food Chemistry*, 126, 1812-1816.
- Chien, P-J., Sheu, F. & Yang, F-H. (2007a). Effects of edible *chitosan* coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78, 225-229.
- Chien, P-J., Sheu, F. & Lin, H-R. (2007b). Quality assessment of low molecular weight *chitosan* coating on sliced red *pitaya*. *Journal of Food Engineering*, 79, 736-740.
- Craviotti, C. (2012a). Capítulo V: Los cambiantes territorios del sistema global de frutas frescas y sus implicancias a nivel agrario. La producción del arándano en Entre Ríos. En *Tramas productivas y agentes sociales en la fruticultura globalizada*. Miño y Dávila Editores. Buenos Aires, Argentina. Pp. 143-164.
- Craviotti, C. (2012b). Producer Relationships and Local Development in Fresh Fruit Commodity Chains: An Analysis of Blueberry Production in Entre Ríos, Argentina. *Regional Studies*, 46, 203-215. DOI: 10.1080/00343404.2011.573779.
- Dal Bello, G. & Perelló, A. (1998). First Report of Leaf Rust of Blueberry Caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Argentina. *Plant Disease*, 82, 1062.

- Daykin, M.E. & Milholland, R.D. (1984). Infection of blueberry fruit by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, 68, 948-950.
- Durango, A.M., Soares, N.F.F. & Andrade, N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17, 336-341.
- Ellis, M.A., Doohan, D., Bordelon, B., Welty, C., Williams, R.N., Funt, R.C. & Brown, M. (2004). Midwest Small Fruit Pest Management Handbook. Bulletin 861. Chapter 4: Highbush Blueberries, 102-121. The Ohio State University. Disponible online: [http://extension.missouri.edu/greene/documents/Horticulture/Blackberry/2016\\_MidwestFruitSprayGuide.pdf](http://extension.missouri.edu/greene/documents/Horticulture/Blackberry/2016_MidwestFruitSprayGuide.pdf). Consultado el 10/02/18.
- Ellis, M.A. & Nita, M. (2008). Organic Small Fruit Disease Management Guidelines. Integrated Management of Blueberry Diseases. Department of Plant Pathology at the Ohio State University / OARDC. Disponible online: <http://www.oardc.ohio-state.edu/fruitpathology>. Consultado el 20/03/2018.
- Escárcega-Galaz, A.A., Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T.J. & Paseiro-Losada, P. (2018). Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, In press. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149>.
- Famá, L., Flores, S.K., Gerschenson, L. & Goyanes, S. (2006). Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 66, 8-15.
- FAO (2016). Disponible online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consultado el 10/02/17.
- Farn (2012). Residuos. Disponible online: [http://servicios2.abc.gov.ar/lainstitucion/caj/descargas/documentos/edu.ambiental/3.Residuos\\_informacion.pdf](http://servicios2.abc.gov.ar/lainstitucion/caj/descargas/documentos/edu.ambiental/3.Residuos_informacion.pdf). Consultado el 10/03/2017.
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q. & Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.

- García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2000). Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch-based Films and Coatings. *Journal of Food Science*, 65, 941-944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09397.x>
- Gorris, L.G.M. & Peppelenbos, H.W. (2003). Envasado de productos hortofrutícolas en atmósferas modificadas. En: Manual de Conservación de Alimentos. Shafuir Rahman, M. Ed. Acribia, España, 469-490.
- Guerber, J.C. & Correll, J.C. (1997). The First Report of the Teleomorph of *Colletotrichum acutatum* in the United States. *Plant Disease*, 81, 1334.
- Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W. & Traber, M.G. (2004). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria × ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 67-78.
- Hartung, J.S., Burton, C.L. & Ramsdell, D.C. (1981). Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, 71, 449-453.
- Hernández Hernández, D. (2014). Estudio Nutritional de Arándano Azul (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi en Los Reyes, Michoacán. (Tesis de Doctorado). Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. INDEC (2007). Censo Nacional Agropecuario 2002: total del país. Resultados definitivos. Buenos Aires.
- INTA (2015). El cultivo de arándano. Disponible online: [http://sipan.inta.gob.ar/productos/ssd/vc/neuquen/ap/PDF/cultivo\\_arandano\\_agrobit.pdf](http://sipan.inta.gob.ar/productos/ssd/vc/neuquen/ap/PDF/cultivo_arandano_agrobit.pdf)
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P. & Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058-2076.
- Kader, A. A. (2007). Atmósferas modificadas en el transporte y el almacenamiento. En: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas. Editor: Kader, A. A., 3<sup>era</sup> ed. California, 157-168.
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A. & Braunegg, G. (2010). Microbial PHA production from waste raw materials. En: *Plastics from bacteria. Natural functions and applications*, Chen G.G.-Q. (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 85-119.

- Krochta, J.M. & De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61-74.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8, 203–226.
- Lambert, D.H. (1990). Postharvest fungi of lowbush blueberry fruit. *Plant Disease*, 74, 285-287.
- Leyte, J.C. & Forney, C.F. (1999a). Controlled Atmosphere Tents for Storing Fresh Commodities in Conventional Refrigerated Rooms. *Hort Technology*, 9, 672-675.
- Leyte, J.C. & Forney, C.F. (1999b). Optimizing flat design for forced air cooling of blueberries packaged in plastic clamshells. *Hort Technology*, 9, 202-205.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X. & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 147-55.
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starches. *Innovations in Food Packaging*, 318-337. 10.1016/B978-012311632-1/50051-6.
- Lourdin, D., Della Valle, G. & Colonna, P. (1995). Influence of amylase content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27. 261-270.
- Luan, Y.S., Feng, L., Xia, X.Y. & An, L.J. (2007). First Report of *Alternaria tenuissima* Causing Disease on Blueberry in China. *Plant Disease*, 91, 464.
- Mitcham, E.J. & Mitchell, F.G. (2007). Sistema de manejo postcosecha: frutas pequeñas. Fresas y frutos de arbusto. En: Tecnología Postcosecha de Cultivos Hortofrutícolas. Editor: Kader, A. A., 3<sup>era</sup> ed. California. 409-415.
- Molina, N., Taiariol, D., Delssin, E. & Serial, C. (2010). Producción de Arándanos en Corrientes - Análisis técnico y económico. Publicación Técnica N° 38. Disponible online: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-arandanos-corrientes-analisis-tecnico-economico.pdf>. Consultado el 20/03/2017.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67–89.
- Navia, D.P., Ayala, A.A. & Villada, H.S. (2014). Interacciones empaque-alimento: migración. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 13(25), 99-113. ISSN 1692 –

3324. Disponible online: <https://revistas.udem.edu.co/index.php/ingenierias/article/viewFile/999/992>
- Nemtsev, S.V., Zueva, O.Y., Khismatullin, M.R., Albulov, A.I. & Varlamov, V.P. (2004). Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 39–43.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W. & Xu, Z. (2007). Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review. *Journal of Food Science*, 72, R87-R100.
- Organización Mundial de Packaging WPO (2009). Packaging and Food Safety. Disponible online: [http://www.worldpackaging.org/i4a/doclibrary/index.cfm?category\\_id=1](http://www.worldpackaging.org/i4a/doclibrary/index.cfm?category_id=1)
- Osés, J., Niza, S., Ziani, K. & Maté, J.I. (2009). Potato starch edible films to control oxidative rancidity of polyunsaturated lipids: effects of film composition, thickness and water activity. *International journal of food science & technology*, 44(7), 1360-1366.
- Paes, S. S., Yakimets, I. & Mitchell, J.R. (2008). Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 788-797.
- Park, S.Y., Jung, S.T. & Marsh, K.S. (2001). Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. *Food Hydrocolloids*, 15, 499-502.
- Parzanese, M. (2010). Películas y recubrimientos. Ficha N°7. Disponible online: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha\\_07\\_PelículaComestible.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_07_PelículaComestible.pdf). Consultado el 15/07/17.
- Pérez-Gago, M.B., Rojas, C. & Del Río, M.A. (2003). Effect of Hydroxypropyl Methylcellulose–Lipid Edible Composite Coatings on Plum (cv. Autumn giant) Quality During Storage. *Journal of Food Science*, 68, 879, 883.
- Pochanavanich, P. & Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 17–21.
- Polashock, J.J., Ehlenfeldt, M.K., Stretch, A.W. & Kramer, M. (2005). Anthracnose fruit rot resistance in blueberry cultivars. *Plant Disease*, 89, 33-38.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J. & Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 367-374.

- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smaghe, G. & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457–1465.
- Rhim, J.W. (2004). Increase in water vapor barrier property of biopolymer-based edible films and coatings by compositing with lipid materials. *Food Science and Biotechnology*, 13(4), 528-535.
- Rindlav, A., Hulleman, S.H.D. & Gatenholm, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, 34, 25-30.
- Rivadeneira, M.F. & Kirschbaum, D.S. (2012) INTA Programa Nacional Frutales – Cadena Arándanos. Disponible online: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena\\_arandano .pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cadena_arandano.pdf)
- Rivadeneira, M.F. (2016). Consolidación del cultivo de arándanos en Argentina evolución y actualidad de la producción. Ministerio de Agroindustria, EEA INTA Concordia. Disponible online: <https://inta.gob.ar/documentos/el-cultivo-de-arandanos-en-argentina-evolucion-y-actualidad-de-la-produccion>. Consultado el 22/04/18.
- Rivera, M.C., Wright, E.R., Pérez, B.A., González Rabelino, P. & Pérez, J.A. (2009). Enfermedades del arándano. En: Guía de Enfermedades, Insectos y Malezas del Arándano. Wright, E. R. (Editor). Buenos Aires: Orientación Gráfica Editora, 1-68.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K. & Maté, J.I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840–846.
- Rodríguez García, S. (2016). Desarrollo y caracterización de una película funcional a base de goma guar y aceite de oliva. (Tesis de grado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro). México.
- Rojas-Grau, M.A., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 875-889.
- Sallam, K.I. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. *Food Chemistry*, 101(2), 592-600.
- Smith, B.J., Magee, J.B. & Gupton, C.L. (1996). Susceptibility of rabbiteye blueberry cultivars to postharvest diseases. *Plant Disease*, 80, 215-218.



- Smith, B. J. (1998). Botrytis blossom blight of southern blueberries: Cultivar susceptibility and effect of chemical treatments. *Plant Disease*, 82, 924-927.
- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y. & Zhang, G. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 347–354.
- Sothornvit, R. & Krotcha, J.M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of  $\beta$ -lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50, 149-155.
- Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M.C.M. & Ninow, J.L. (2009). Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 20–25.
- Talja, R.A., Helén, H., Roos, Y.H. & Jouppila, K. (2008). Effect of type and content of binary polyol mixtures on physical and mechanical properties of starch-based edible films. *Carbohydrate Polymers*, 71, 269-276.
- Togrul, H. & Arslan, N. (2004). Extending shelf-life of peach and pear by using CMC from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in emulsions. *Food Hydrocolloids*, 18, 215-226.
- Tournas, V.H. & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 11-17.
- Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C. & Pan, C.L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, 68, 170-177.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2011). Water interactions and microstructure of *chitosan*-methylcellulose composite films as affected by ionic concentration. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2290-2295.
- Vásconez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado, J. & Gerschenson, L.N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of *chitosan*-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42, 762-769.
- Vásquez, P., Baldomá, J.A., Wright, E.R., Pérez, A. & Divo de Sesar, M. (2007). First Report of Blueberry Botrytis Blight in Buenos Aires, Entre Ríos, and Córdoba, Argentina. *Plant Disease*, 91, 639.

- Velázquez, P.D., Carbajo, M.S., Farías, M.F. & Torres Leal, G.J. (2010). Comportamiento de seis variedades de arándano frente a la podredumbre de poscosecha causada por *Alternaria tenuissima*, en los departamentos Monteros y Chicligasta (Tucumán). Conference: XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Resumen F-P 026., pág. 141. Rosario, Santa Fe, Argentina. ISBN 978-987-97812-6-
- Verma, N., MacDonald, L. & Punja, Z.K. (2006). Inoculum prevalence, host infection and biological control of *Colletotrichum acutatum*: Causal agent of blueberry anthracnose in British Columbia. *Plant Pathology*, 55, 442-450.
- Verma, N., MacDonald, L. & Punja, Z.K. (2007). Environmental and host requirements for field infection of blueberry fruits by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia. *Plant Pathology*, 56, 107-113.
- Wharton, P.S. & Schilder, A.C. (2008). Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. *Plant Pathology*, 57, 122-134.
- Wright, E.R., Rivera, M.C. & Flynn, M.J. (1998). First report of *Pestalotiopsis guepini* and *Glomerella cingulata* on blueberry in Buenos Aires (Argentina). *EPPO Bulletin*, 28, 219-220.
- Wright, E.R., Rivera, M.C., Esperón, J., Cheheid, A. & Rodríguez Codazzi, A. (2004). *Alternaria* Leaf Spot, Twig Blight, and Fruit Rot of Highbush Blueberry in Argentina. *Plant Disease*, 88, 1383.
- Wright, E.R., Fernández, R.L., Benva, M., Pérez, J.A., Rivera, M.C., Roncoroni, S., Nicolini, F., Vásquez, P.E., Ciorca, P. & Pérez, B.A. (2008a). Deterioro poscosecha de arándano en Entre Ríos y Buenos Aires, Argentina. En: Avances en cultivos frutales no tradicionales. Arándanos–Cerezas–Frutillas–Granadas. Divo de Sesar, M., Rocca, M. & Vilella, F. (Editores). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 63-74.
- Wright, E.R., Pérez, B.A., Roncorini, S., Nicolini, F., Pasut, F., Moreno, A., Vásquez, P. E., Lara, M., Fernández, R.L., Rabellino, M., Benva, M., Borsarelli, M., Cornellati, D., Pérez, J.A., Ciorca, P., Divo de Sesar, M., Ascitutto, K., Trejo, E., Colavolpe, B. & Rivera, M.C. (2008c). Distribución e incremento de patógenos de arándano en Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina, en 2007/2008. En Avances en cultivos frutales no tradicionales. Arándanos –Cerezas –Frutillas –Granadas. Divo de Sesar, M., Rocca, M. & Vilella, F. (Editores). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 39-45.

- Xu, Y., Ren, X. & Hanna, M.A. (2005). Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 1684-1691.
- Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Shinohara, H., Koitabashi, M. & Tsushima, S. (2007). Occurrence and development of *Colletotrichum acutatum* on symptomless blueberry bushes. *Plant Pathology*, 56, 871-877.
- Zamani, A., Edebo, L., Sjostrom, B. & Taherzadeh, M.J. (2007). Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules*, 8, 3786-3790.
- Zapata, L., Heredia, A., Malleret, A., Quinteros, F., Cives, H. & Carlazara, G. (2013). Evaluación de parámetros de calidad que ayuden a definir la frecuencia de recolección de bayas de arándanos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14(2), 186-194.
- Zhong, F., Li, Y., Ibáñez, A.M., Oh, M.H., McKenzie, K.S. & Shoemaker, C. (2009). The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. *Food Hydrocolloids*, 23, 406-414.

## **II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

---

## **II. Objetivos e Hipótesis**

### **II.1 Objetivo general**

Desarrollar y caracterizar envases biodegradables a partir de hidrocoloides para la preservación de la calidad de arándanos almacenados en condiciones de refrigeración.

### **II.2 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos propuestos son:

a) Caracterizar los componentes mayoritarios de las formulaciones responsables del desarrollo de la matriz filmogénica

Hidrocoloides a utilizar: almidón de maíz y quitosano como componentes

b) Desarrollar materiales compuestos a partir de almidón de maíz y quitosano optimizando su formulación.

c) Desarrollar películas activas con capacidad antimicrobiana mediante el agregado de compuestos activos que se obtienen como subproductos de la industria citrícola y aditivos específicos.

b) Caracterizar las propiedades de los materiales obtenidos evaluando su resistencia mecánica, a la humedad, capacidad antimicrobiana, microestructura, estabilidad y capacidad de termosellado.

c) Utilizar los materiales compuestos activos desarrollados en la elaboración de envases destinados a la preservación de la calidad de arándanos, analizando sus atributos de calidad y la evolución de sus parámetros fisiológicos durante el almacenamiento refrigerado.

### **II.3 Hipótesis de trabajo**

- Es posible obtener materiales compuestos a partir de almidón de maíz y quitosano y la mezcla de ambos biopolímeros con aditivos específicos.

- Los materiales compuestos obtenidos son biodegradables, tienen adecuadas propiedades de resistencia mecánica y a la humedad y presentan capacidad de termosellado.

- La incorporación de compuestos activos permite la funcionalización de los materiales desarrollados confiriéndoles actividad antimicrobiana.

## Objetivos e Hipótesis

---

- Se pueden desarrollar envases a partir de los materiales obtenidos que permiten preservar la calidad de arándanos con la ventaja de su bajo impacto ambiental, baja permeabilidad a gases y capacidad antimicrobiana.

# CAPÍTULO 1

---

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES:

QUITOSANO Y ALMIDÓN DE MAÍZ

## Capítulo 1. Caracterización de los Componentes: Quitosano y Almidón de maíz

### 1.1 Introducción

#### 1.1.1 Quitosano

Es un polímero ampliamente difundido en la naturaleza, siendo el segundo más abundante luego de la celulosa. Se obtiene por desacetilación de la quitina que se encuentra en los exoesqueletos de los artrópodos, insectos y algunos hongos. La principal fuente de este biopolímero son los desechos sólidos de la industria de mariscos (langosta, cangrejo, camarón) (Gortari & Hours, 2013; Kandra y col., 2012; Younes & Rinaudo, 2015), los cuales representan entre 75 y 85% del peso vivo. Estos residuos del procesamiento de mariscos contienen entre 14 y 35% de quitina asociada a proteínas, lípidos, pigmentos y depósitos de calcio. El aprovechamiento de estos desechos no sólo permite obtener este biopolímero de alto valor agregado sino que además permite reducir los problemas ambientales que su disposición genera.

El proceso de obtención del quitosano a partir de la quitina extraída de los exoesqueletos de crustáceos, se produce básicamente a través de cuatro etapas: desmineralización, desproteinización, decoloración y desacetilación. En primer lugar los residuos sólidos se limpian, se secan, se muelen hasta pulverizarse y se someten a un proceso de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico, etapa que convierte a los carbonatos en cloruros y solubiliza los minerales. Luego, se somete a una hidrólisis alcalina para eliminar la matriz y solubilizar a las proteínas, las cuales arrastran consigo grasas y pigmentos que se encuentran en los caparazones. Al concluir estas dos etapas se obtiene la quitina en polvo, la que puede ser comercializada como tal (Mármol y col., 2004). Posteriormente, la etapa de desacetilación implica un tratamiento de la quitina con álcali fuerte a altas temperaturas, lo cual genera la sustitución de los grupos acetamida de la molécula de quitina por grupos amino (Fig. 1.1).

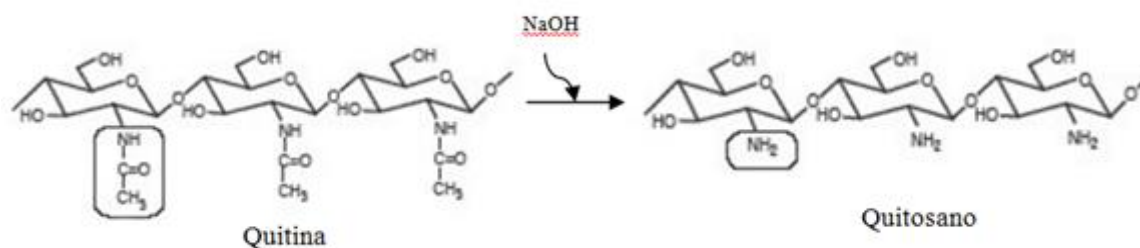


Figura 1.1: Reacción de desacetilación de quitina para obtener quitosano.



Por esto, se dice que el quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina. La diferencia entre ambas moléculas radica en el grupo sustituyente del carbono 2, donde la quitina posee un grupo acetamida mientras que en el quitosano ese grupo es desacetilado resultando en un grupo amino (Pastor & Higuera, 2004). Esta modificación en la estructura le confiere al quitosano mayor solubilidad y reactividad comparado con la quitina.

Como se refleja en su estructura (Fig. 1.2), se trata de un polisacárido catiónico, de cadena lineal y peso molecular elevado. Asimismo presenta fácil aplicación y es ambientalmente amigable (Lárez Velazquez, 2006).

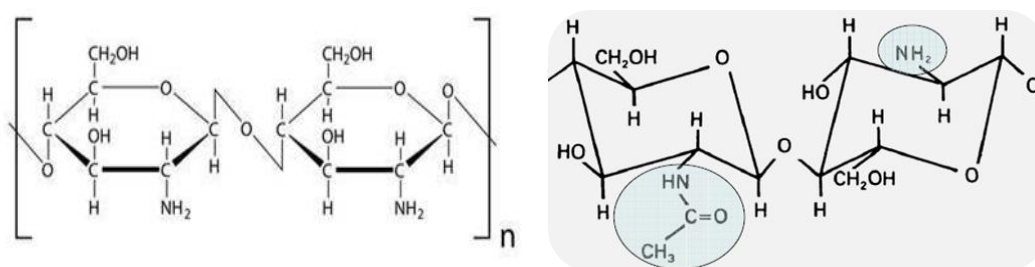


Figura 1 2: Estructura del quitosano poli[ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos].

La abundancia de grupos hidroxilo y de grupos amino altamente reactivos, y la tendencia a formar enlaces intra e intermoleculares por puentes de hidrógeno, da como resultado agregados lineales que son prácticamente insolubles en agua (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

### 1.1.1.1 Peso molecular y grado de desacetilación

La quitina y el quitosano presentan variabilidad en su grado de polimerización, en la relación entre unidades acetiladas/desacetiladas y en su secuencia, por lo que ambos polímeros se caracterizan por su peso molecular y su grado de desacetilación (GD) que representa la fracción de grupos aminos libres en la cadena polimérica. Asimismo, de acuerdo a estos parámetros estos biopolímeros presentarán diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

El proceso de desacetilación depende de variables como la concentración de álcali, la temperatura y el tiempo de reacción; en general la desacetilación es incompleta y se obtiene una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción mencionadas. Como resultado se generan

materiales con distinto GD, longitudes de cadena, distribución de las unidades acetiladas y desacetiladas y distinto pKa, que se denominan quitosanos (Lárez, 2003).

En general, el GD del quitosano es igual o superior al 50% (Crini y col., 2009) mientras que el de la quitina puede ser menor al 10% (Mourya & Inamdar, 2008) e incluso los grupos aminos pueden estar totalmente acetilados, como es el caso del polímero extraído de diatomeas denominado quitano.

El grado de desacetilación es un parámetro importante a la hora de seleccionar el quitosano para diversas aplicaciones. Éste influirá en sus propiedades fisicoquímicas, en su biodegradabilidad, solubilidad en soluciones ácidas, hinchamiento en agua, actividad inmunológica. En general, el quitosano es insoluble a pH neutro o alcalino, y soluble en soluciones ácidas de ácido acético, láctico, clorhídrico y glutámico. En medio ácido el grupo amino se protona y la molécula se carga positivamente, volviéndose más soluble e hidrofílica (Kristol y col., 1993).

### **1.1.1.2 Actividad antimicrobiana del quitosano**

El interés en el uso del quitosano en diversas aplicaciones reside en su actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos. A pesar de los numerosos estudios publicados en relación a la actividad antimicrobiana, no se conoce exactamente el mecanismo de acción del polímero.

En literatura, hay varias teorías que intentan explicar su modo de acción (Kong y col., 2010; Raafat y col., 2008; 2009; Goy y col., 2009). Un mecanismo explica que se producen interacciones entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y las cargas negativas de las paredes celulares de los microorganismos, modificando su permeabilidad (Leuba & Stossel, 1985; Kong y col., 2008; Tripathi y col., 2008). Otra teoría se basa en la activación de procesos de defensa en el tejido de los microorganismos por la molécula de quitosano, actuando como un agente de unión al agua e inhibiendo varias enzimas al bloquear sus centros activos. Otra explicación sugiere que la acción del quitosano se debe a su actuación como agente quelante, uniéndose selectivamente a los metales y luego inhibiendo la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. Se ha propuesto además que en el caso de quitosano de alto peso molecular su acción antimicrobiana se debe a la formación de una capa polimérica impermeable sobre la superficie de la célula, alterando así la permeabilidad celular y bloqueando la entrada de nutrientes en la célula (Choi y col.,

2001; Eaton y col., 2008). También se ha postulado que el quitosano de bajo peso molecular penetra en el citosol de los microorganismos para unirse al ADN, dando como resultado interferencia en la síntesis de mRNA y proteínas (Rabea y col., 2003; Dutta y col., 2012). Por último, su acción podría deberse a la adsorción y floculación de sustancias electronegativas en la célula por parte de la molécula de quitosano, perturbando las actividades fisiológicas de los microorganismos y causando su muerte (Rabea y col., 2003; Kong y col., 2008).

### **1.1.2 Almidón de maíz**

Los almidones se encuentran comúnmente en los granos de cereales, raíces y tubérculos, legumbres y frutos; se utilizan principalmente en las industrias alimenticias, del papel y textil. Los principales tipos de almidones comercialmente disponibles provienen de varias fuentes: maíz, trigo, arroz, mandioca y papa y minoritariamente de sorgo, sagú, arrurruz, cebada y guisante.

Sobre la base del contenido de amilosa, los almidones se pueden clasificar como almidones de alta amilosa (>50%), regulares (25-15%) y cerosos (<2%). En su forma nativa, el almidón tiene una estructura y composición bastante variable, dependiendo de las condiciones en las que crece el cultivo del que deriva. Además, pueden obtenerse mutantes genéticos con características específicas.

Los gránulos de almidón están compuestos por dos polímeros, amilosa y amilopectina. La amilosa está constituida por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces 1-4, con una longitud promedio de 100 a 10000 unidades de glucósidos (Fig. 1.3). Es un polímero lineal o escasamente ramificado, dependiendo de su origen. El número de ramificaciones puede variar desde 2.9 para el almidón de maíz hasta 9.8 para el almidón de batata (Jay-Lin, 2009). Por otra parte, la amilopectina es un polímero altamente ramificado formado por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 (Van Soest & Vliegenthart, 1997; García y col., 1999; 2000) y enlaces  $\alpha$ -1,6 que dan lugar a las ramificaciones de 20 a 30 unidades de longitud (Fig. 1.4) (Shannon y col., 2009).

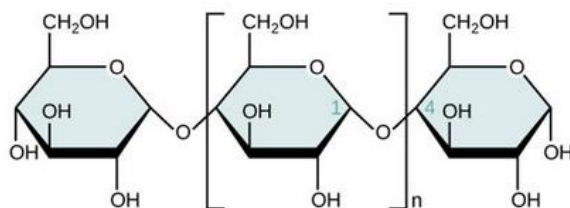


Figura 1.3: Estructura de la amilosa.

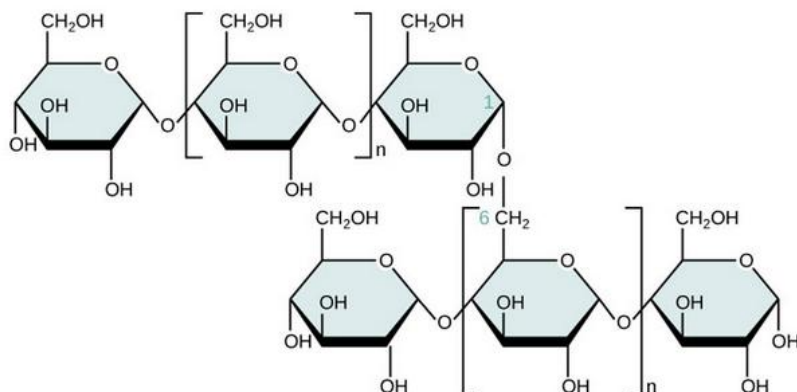


Figura 1.4: Estructura de la amilopectina.

### 1.1.2.1 Estructura de los gránulos

El contenido de amilosa en los almidones nativos se encuentra entre 11 y 37%, aunque se comercializan actualmente almidones modificados genéticamente con contenidos mayores de este polímero (55-70%) (Schwartz & Whistler, 2009) y este valor depende de la fuente de almidón (Tabla 1.1). Los almidones con alto contenido de amilosa se utilizan en la industria de las golosinas, para obtener geles más fuertes, que mantengan su forma; también este tipo de almidones se usan para espesar salsas y en la formulación de películas biodegradables. Las propiedades mecánicas de las películas de almidón, también dependen del contenido de amilosa: mientras que las películas de amilopectina pura son quebradizas, las de amilosa pura presentan mayor resistencia a la tracción y mayor elongación. La estructura ramificada de la amilopectina produce películas con propiedades mecánicas pobres (Mali y col., 2004; Tharanathan, 2003).

Tabla 1.1: Contenido de amilosa y amilopectina de diversas fuentes de almidón.

Tipo de almidón	Contenido de amilosa	Contenido de Amilopectina
Maíz	25	75
Papa	20	80
Trigo	25	75
Arroz	19	81
Mandioca	17	83

La forma y el tamaño de los gránulos de almidón son extremadamente diversos y dependen del material de partida. Los gránulos pequeños se hallan en semillas de amaranto y quinoa (1  $\mu\text{m}$ ), mientras que el almidón de papa posee gránulos más grandes (120  $\mu\text{m}$ ). Así mismo, la forma de los gránulos puede ser esférica, poligonal, elipsoidal o irregular. Por otra parte, la organización estructural de los gránulos es bastante compleja, consiste en anillos amorfos y cristalinos, en los cuales las moléculas de amilopectina se encuentran ubicadas radialmente.

### 1.1.2.2 Gelatinización y Retrogradación

Esta estructura altamente organizada hace que los gránulos de almidón sean insolubles en agua fría. Por ello, antes de utilizarse, el almidón debe ser sometido a un proceso de gelatinización que consiste en un tratamiento térmico en presencia de agua, que da como resultado una suspensión acuosa. Durante este proceso ocurren cambios irreversibles en la estructura del almidón: los gránulos se hinchan y se rompen, se destruyen los puentes de hidrógeno, en consecuencia los cristales se funden y la viscosidad aparente aumenta. Todo esto causa pérdida de cristalinidad y lixiviación de amilosa fuera del gránulo, provocando un aumento de la viscosidad aparente de la suspensión. Ésta se comporta reológicamente como un gel, dependiendo de la cantidad de amilosa lixiviada.

La gelatinización depende de la difusión del agua en el gránulo (contenido de agua), de la temperatura y de las características del almidón. El intervalo de temperatura en el que se lleva a cabo la gelatinización dependerá de estos factores que también afectarán las características del almidón gelatinizado, tales como el comportamiento reológico de la

suspensión de almidón, la retrogradación de ésta durante el almacenamiento y las propiedades mecánicas de las películas obtenidas a partir de esta materia prima.

La retrogradación es un fenómeno que ocurre cuando una suspensión de almidón gelatinizado se deja enfriar hasta temperatura ambiente o menores. En estas condiciones las cadenas lineales de amilopectina forman enlaces puente de hidrógeno entre ellas, y se produce la insolubilización y precipitación de las mismas. Cada tipo de almidón tiene una tendencia diferente a la retrogradación que está relacionada con su contenido de amilosa.

El almidón de maíz presenta una serie de propiedades que lo convierten en una buena elección como material para formular películas: presenta buena capacidad filmogénica, es abundante, de bajo costo y se encuentra ampliamente difundido. Existen numerosos estudios que utilizan almidón para obtener materiales biodegradables de diferente origen vegetal (Oliveira de Moraes y col., 2013; Chen y col., 2014; Cano y col., 2015). Los materiales derivados de almidón son termosellables, y en presencia de plastificantes, tales como el agua, sorbitol o glicerol, se convierte en almidón termoplástico lo que permite su procesamiento mediante extrusión (Moscicki y col., 2012). La extrusión consiste en un proceso continuo en el cual se aplican altas temperaturas y grandes fuerzas de cizallamiento, lo que provoca que el plastificante penetre en los gránulos de almidón y rompa su estructura cristalina. Consecuentemente, los cristales se funden y se forma una masa continua, amorfa o semicristalina dependiendo de la cantidad de plastificante y la composición del almidón (Menegalli, 2017).

### **1.2 Materiales y métodos**

Para la formulación de las suspensiones formadoras de film (SFF), se emplearon dos biopolímeros. Uno de ellos fue almidón de maíz provisto por Glutal S.A. (Buenos Aires, Argentina). El otro polímero utilizado fue quitosano adquirido de tres proveedores distintos, cada uno con diferente peso molecular. El quitosano de alto peso molecular (APM) fue comprado a Sigma Aldrich (Estados Unidos); el de peso molecular medio (MPM) fue provisto por Parafarm (Argentina) y finalmente, el quitosano de bajo peso molecular (BPM), marca RaiSan® fue comprado a Ftalosur S.A. (Argentina; número de referencia del proveedor: 6A/F47/5000/1.5.13).

Para las determinaciones de peso molecular y grado de desacetilación se empleó cloruro de sodio y ácido acético glacial, ambos de grado analítico provistos por Anedra (Argentina).

### 1.2.1 Determinación del peso molecular medio viscosimétrico de los quitosanos utilizados

La medida de la viscosidad de soluciones diluidas de polímeros o método viscosimétrico consiste en un método simple y rápido (Ravi Kumar, 2000) para determinar el peso molecular de estos compuestos.

En soluciones de polímeros de cadena lineal, la viscosidad es elevada debido a su tamaño y al volumen hidrodinámico que ocupan, experimentando así gran resistencia al movimiento. La viscosidad depende de: la naturaleza del polímero y del disolvente, las interacciones con el solvente, la concentración, la temperatura y del peso molecular.

Este método es aplicable a polímeros de cadena lineal o ligeramente ramificada; cuando se trata de moléculas esféricas o altamente ramificadas el resultado no es confiable.

La determinación del peso molecular del quitosano, se llevó a cabo por el método mencionado mediante el empleo de un viscosímetro capilar Cannon-Fenske (serie 200, modelo 120205, IVA, Argentina) a  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , dispuesto como muestra la Figura 1.5.

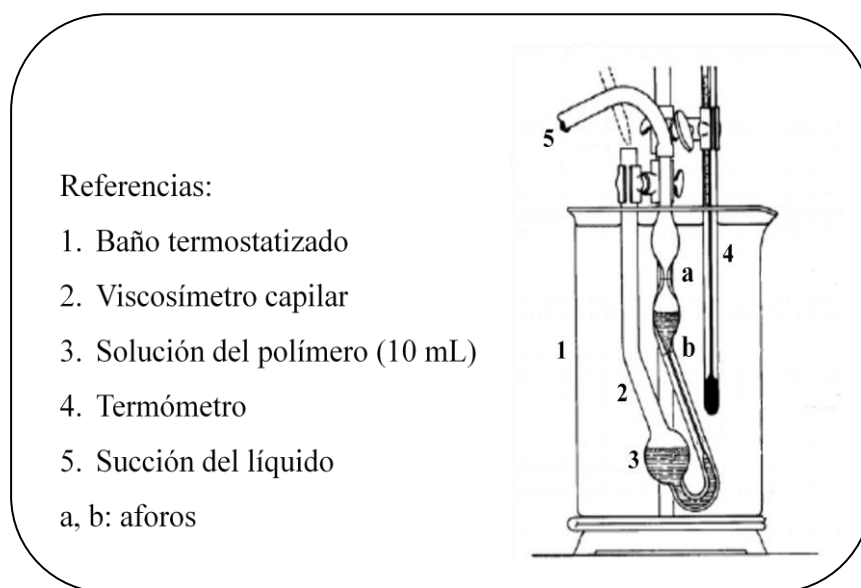


Figura 1.5: Viscosímetro capilar y dispositivo para determinación del peso molecular medio viscosimétrico.

La viscosidad de un fluido se puede relacionar con el tiempo requerido para que un volumen determinado de disolución atraviese dos marcas sucesivas de un capilar por efecto de la gravedad. Esta relación puede obtenerse a partir de la ecuación de Hagen-Poiseuille (Painter & Coleman, 1994):

$$v = \frac{\pi \times \Delta P \times r^4}{8 \times \eta \times l} \quad (1.1)$$

Donde  $v$  es el flujo volumétrico del fluido (y también puede expresarse como  $v = V/t$ , donde  $V$  es el volumen de fluido desplazado y  $t$  el tiempo empleado a tal fin),  $\Delta P$  es la diferencia de presión que mantiene el flujo,  $r$  es el radio del capilar,  $\eta$  es la viscosidad y  $l$  es la longitud del capilar. Reemplazando  $v$  por su expresión equivalente y reordenando, se puede obtener la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{\pi \times \Delta P \times r^4 \times t}{8 \times V \times l} \quad (1.2)$$

Puede observarse que esta expresión relaciona la viscosidad con el tiempo, por lo que es posible determinar el tiempo que tarda un polímero en solución en atravesar una sección del viscosímetro capilar y este parámetro es directamente proporcional a la viscosidad de la solución.

Para este ensayo, se prepararon soluciones diluidas de quitosano de concentración variable (0.001 a 0.005 g mL<sup>-1</sup>) usando un sistema acuoso compuesto de ácido acético (Anedra, Buenos Aires, Argentina) 0.1 M y cloruro de sodio (Anedra, Buenos Aires, Argentina) 0.2 M como disolvente. Las soluciones se filtraron antes de las determinaciones de viscosidad, que se llevaron a cabo a las velocidades de corte más bajas permitidas dentro del error experimental y de la meseta newtoniana, lo que es un requisito para este método (Ravi Kumar, 2000).

Se determinó el tiempo de recorrido de un volumen fijo de las soluciones diluidas de quitosano ( $t$ ) y del disolvente ( $t_0$ ) entre dos marcas consecutivas del capilar (aforos a y b, Fig. 1.5). Asimismo se determinó el tiempo que tardó el disolvente utilizado en el ensayo.

A partir de estos tiempos, se calcularon dos variables que comúnmente se utilizan para soluciones: la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ) y la viscosidad relativa ( $\eta_r$ ), las cuales se obtuvieron de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad (1.3)$$

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} \approx \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (1.4)$$

Donde  $\eta$  y  $\eta_0$  son las viscosidades de la solución y del disolvente, respectivamente;  $t$  es el



tiempo medido entre dos marcas sucesivas del capilar y  $t_0$  es el tiempo correspondiente al disolvente en el mismo capilar.

Ahora bien, para considerar el efecto de la concentración ( $c$ ) en la viscosidad, se puede utilizar una relación demostrada empíricamente por Huggins (1942) y Kramer (1938), que puede describirse mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} \approx [\eta] + k_H[\eta]^2 c \quad (1.5)$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} \approx [\eta] + k_k[\eta]^2 c \quad (1.6)$$

Donde  $k_H$  y  $k_k$  son las constantes de Huggins y Kramer (adimensionales), respectivamente;  $c$  es la concentración de la solución, en  $\text{g mL}^{-1}$ ;  $\eta_{sp}$  es la viscosidad específica y  $\eta_r$  es la viscosidad reducida. Para soluciones diluidas, graficando las ecuaciones 1.5 y 1.6 se obtienen dos líneas rectas, las cuales extrapoladas a concentración cero, coinciden en la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ . Este parámetro, expresado en  $\text{mL g}^{-1}$ , es una medida del volumen hidrodinámico que las macromoléculas ocupan en solución, está asociado al tamaño del polímero y permite estimar el peso ( $M_\eta$ ) molecular del polímero en solución. Así, el peso molecular medio viscosimétrico del quitosano se calculó a partir de los datos de viscosidad intrínseca experimental  $[\eta]$  usando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada-Staudinger:

$$[\eta] = K \times (M_\eta)^a \quad (1.7)$$

Donde  $K = 1.81 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$  y  $a = 0.93$  (Roberts & Domszy, 1982); estas constantes son específicas para el polímero y el disolvente utilizados.

### 1.2.2 Determinación del grado de desacetilación de los quitosanos utilizados

El grado de desacetilación se determina mediante valoración potenciométrica según el método descrito por Motta de Moura y col. (2011) con ligeras modificaciones.

De acuerdo a este método, el quitosano se expone a un exceso de solución de ácido clorhídrico, lo que conduce a la protonación del grupo amino libre del polímero. Posteriormente, se valora esta solución de polímero con NaOH, éste reacciona primero con el ácido libre en la solución y luego desplaza de la molécula de quitosano el anión cloruro

unido al grupo amino libre del quitosano. Como consecuencia, el quitosano precipita al encontrarse en un medio neutro. Al graficar como varía el pH en función del volumen de la solución titulante, se obtiene una curva con 2 puntos de inflexión; uno correspondiente a la titulación del exceso de ácido y el otro a la titulación del quitosano protonado, respectivamente. Entonces, la diferencia de volumen de NaOH entre estos dos puntos corresponde al ácido consumido para la protonación de los grupos amino libres del polímero.

Para el ensayo, se pesaron 0.3 gramos de quitosano y se disolvieron en 25 ml de solución 0.1 M de HCl (Anedra, Buenos Aires, Argentina). La fuerza iónica se ajustó a 0.1 M añadiendo KCl (Anedra, Buenos Aires, Argentina) a la solución. La titulación potenciométrica se realizó con solución 0.1 M de NaOH estándar (Anedra, Buenos Aires, Argentina) usando un pHmetro EC30 HACH (HACH Instruments, Loveland, CO, EEUU). El punto final de la titulación se determinó por el método de la primera derivada a partir de la curva de titulación obtenida (pH en función de volumen de titulante). El grado de desacetilación (DD) se calculó como el porcentaje de grupos amino libres presentes en la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%DD = \frac{16.1 \times (V_{e2} - V_{e1}) \times C_{NaOH}}{m_M} \quad (1.8)$$

Donde  $V_{e2}$  y  $V_{e1}$  son el volumen del segundo y primer punto de equivalencia, respectivamente, y  $C_{NaOH}$  es la concentración del titulante utilizado. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

### 1.2.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier

La espectroscopía de infrarrojo (IR) es una de las técnicas analíticas más importantes para establecer la identidad de un compuesto (Kumirska y col., 2010) ya que cada grupo funcional tiene un modo de absorción característico que se presenta en el espectro como un pico o banda. Este método se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja y aporta información acerca del tipo de uniones que se establecen cuando se mezclan con otras sustancias. Durante la excitación es necesaria una variación del momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que puede asociarse a vibraciones de tensión (simétricas o asimétricas) o de flexión.

Para el análisis espectroscópico, las muestras de quitosano se molieron y se mezclaron con KBr de calidad espectroscópica, luego se comprimieron para obtener pastillas.

Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro IR (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, EEUU) en el rango de longitudes de onda de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ; se realizaron 64 escaneos. Los espectros se analizaron utilizando el software Omnic 8 (Thermo Scientific, Madison, EEUU).

## 1.2.4 Caracterización del almidón de maíz

### 1.2.4.1 Determinación del contenido de amilosa y amilopectina

La determinación del contenido de amilosa se realizó mediante un método basado en la afinidad de la fracción de amilosa para formar complejos coloreados con yodo, los cuales pueden ser cuantificados espectrofotométricamente (Morrison & Laignelet, 1983). En primer lugar, se deben remover los lípidos presentes en el almidón ya que éstos podrían interferir en la determinación (MacGregor & Fincher, 1993).

Para ello, se pesaron 70-80 mg de almidón en un tubo y se añadieron 10 mL de solución 1:9 de urea 6M-dimetilsulfóxido (DMSO). El tubo se colocó en una estufa a 100 °C durante 1 h, se retiró y dejó enfriar. Posteriormente, se tomaron 0.5 mL de la solución, se transfirieron a un tubo de 10 mL y se pesaron; este paso se realizó por duplicado. Se adicionaron 5 mL de etanol 99.5% v/v para remover los lípidos y se centrifugó durante 30 min a 5000 gramos, descartándose el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de la solución de urea-DMSO y se mezcló en un vórtex, obteniéndose una solución clara. El contenido se transfirió a un matraz de 50 mL y se adicionaron aproximadamente 25 mL de agua destilada, 1 mL de solución de  $\text{I}_2$  (2 mg  $\text{I}_2$  y 20 mg KI /mL), se llevó a volumen con agua destilada y se homogeneizó. Se midió la absorbancia a 635 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650 (Palo Alto, CA, EEUU) y se realizaron los cálculos (Ecuaciones).

$$\text{Valor azul} = \frac{\text{Absorbancia} \times 100}{2 \times g \text{ solución} \times mg \text{ almidón}} \quad (1.9)$$

$$\text{Porcentaje de amilosa} = 28.414 \times \text{Valor azul} \quad (1.10)$$

Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

### 1.2.4.2 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido

Se estudiaron las transiciones de fase del almidón de maíz mediante calorimetría diferencial de barrido. Esta metodología permite medir el flujo calórico diferencial requerido para mantener una muestra y una referencia inerte a la misma temperatura, cuando son sometidas a calentamiento y enfriamiento controlados.

Para este ensayo se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Polymer Laboratories (Rheometric Scientific Surrey, Reino Unido) con un software PL-V5.41. Se empleó indio para la calibración de la temperatura y flujo de calor. Se pesaron 7-10 mg de suspensión acuosa de almidón al 20% p/p y se colocaron en cápsulas de aluminio previamente pesadas las cuales se sellaron herméticamente. Como referencia se utilizó una cápsula vacía. Las muestras se calentaron de 10 a 120 °C a una velocidad de 10 °C/min. Luego, las cápsulas analizadas se perforaron y se mantuvieron en estufa a 105°C hasta peso constante para determinar el peso seco de las muestras. Se obtuvieron los termogramas de flujo de calor ( $dQ/dT$ ) en función de la temperatura ( $T$ ), y a partir de ellos se determinaron las entalpías ( $\Delta H$ , mJ/mg de muestra seca) y las temperaturas de la transición (temperatura de inicio  $T_0$ , de pico  $T_p$  y final  $T_f$ , °C) con el software PL-V5.41.

En la Figura 1.6 se muestra un termograma típico y cada uno de los parámetros térmicos determinados a partir del mismo.

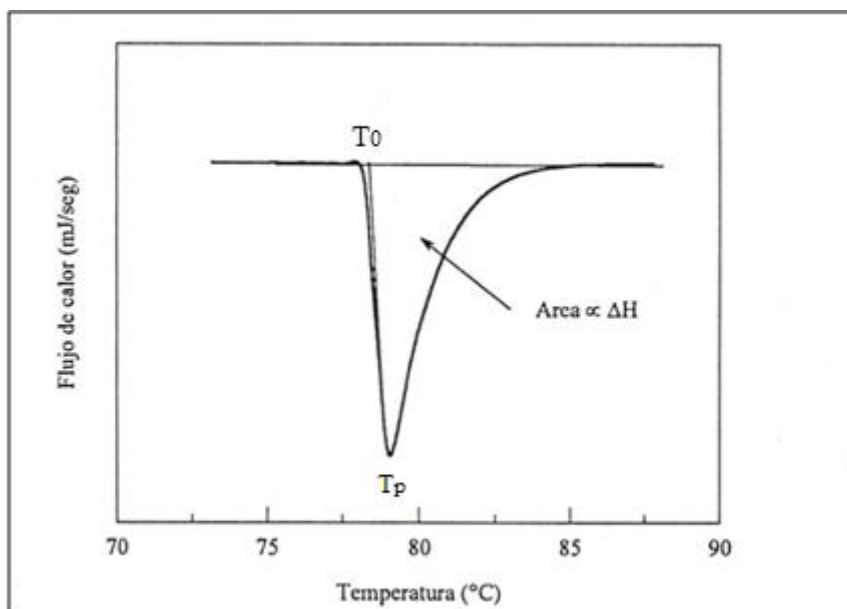


Figura 1.6: Termograma típico obtenido por DSC.  $T_0$ : temperatura de inicio;  $T_p$ : temperatura de pico; y área de pico proporcional a la entalpía  $\Delta H$ .

### 1.2.4.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier

Al igual que para el estudio del quitosano, se obtuvieron los espectros de FTIR del almidón de maíz. Los mismos se registraron en la región 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  en el modo de transmitancia realizando 60 escaneos por ensayo. Las determinaciones se efectuaron a temperatura ambiente.

### 1.2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el software Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD) a través del análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de medias se utilizó el test de las diferencias mínimas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%.

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Peso molecular de los quitosanos utilizados

No fue posible estimar el peso molecular y el grado de acetilación del quitosano disuelto en la solución comercial RaiSan®, por lo que se presentan las características proporcionadas por el proveedor.

Los resultados de tiempos de recorrido de las soluciones de quitosano de peso molecular medio Parafarm en el viscosímetro capilar se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Tiempos de recorrido de soluciones de quitosano en el viscosímetro capilar.

Concentración ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Tiempo (s)
Solvente*	24.19
0.0010	30.44
0.0020	40.66
0.0030	54.14
0.0040	61.21
0.0049	78.74

\*Solvente utilizado (NaCl 0.2M y ácido acético 0.1M)

A partir de estos resultados, se calcularon la viscosidad reducida y la viscosidad específica, y se graficaron en función de la concentración (Fig. 1.7).

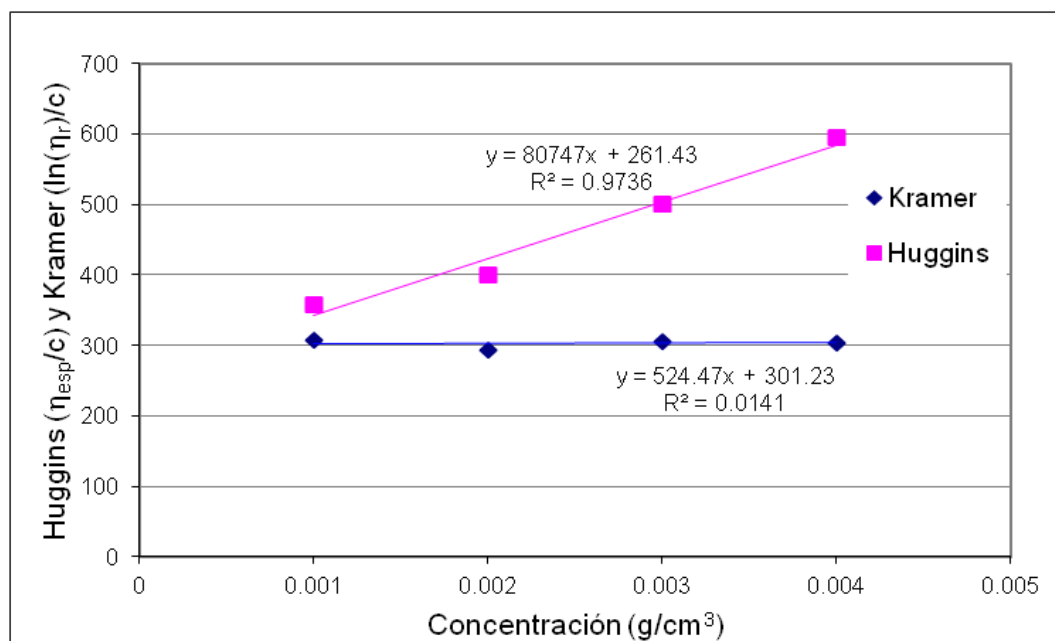


Figura 1.7: Viscosidad relativa de Huggins y Kramer en función de la concentración de polímero.

La viscosidad intrínseca se obtiene mediante la intersección de ambas rectas cuando la concentración tiende a 0. Por lo tanto, la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  resulta  $240.58 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Tomando las constantes de Mark-Houwink:  $K = 1.81 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  y  $a = 0.93$ , el peso molecular del quitosano Parafarm resulta:  $M_w = 444 \text{ KDa}$

La misma metodología se utilizó para determinar el peso molecular del quitosano de APM provisto por Sigma Aldrich.

A continuación se presentan los resultados de los pesos moleculares medios ( $M_\eta$ ) de los diferentes quitosanos utilizados a lo largo de la presente Tesis doctoral (Tabla 1.3).

Tabla 1.3: Peso molecular y grado de desacetilación de los quitosanos utilizados.

Quitosano	Peso molecular ( $M_\eta$ , kDa)	Grado de desacetilación (%)
BPM	270 <sup>c*</sup>	85 <sup>a*</sup>
MPM	444 <sup>b</sup>	83.72 ± 3.22 <sup>a</sup>
APM	1390 <sup>a</sup>	86.25 ± 0.47 <sup>a</sup>

\*Valores informados por el proveedor. BPM: bajo peso molecular, MPM: peso molecular medio, APM: alto peso molecular. Los valores reportados corresponden a los valores medio ± desviación estándar. Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Como puede observarse en la Tabla 1.3, los pesos moleculares medios fueron significativamente diferentes lo que indica que los polímeros usados exhibieron diferentes grados de polimerización. Por lo tanto, el quitosano utilizado en este trabajo se clasificó según su peso molecular y se estudió el efecto de esta característica sobre el comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas y las propiedades de las películas obtenidas.

### 1.3.1.1 Determinación del grado de desacetilación

Los resultados de la titulación potenciométrica para el quitosano de MPM se muestran en la Tabla 1.4. En la Figura 1.8 se puede observar una de las curvas de titulación obtenidas, en donde se distinguen los dos puntos de inflexión: el primero debido a la titulación del ácido clorhídrico en exceso, y el segundo punto correspondiente a la titulación del quitosano protonado, como ya se mencionó.

Tabla 1.4: Determinación del DD de quitosano de MPM: puntos de inflexión obtenidos en la valoración potenciométrica.

	Muestras		
$V_1$ (mL)	18.5	19.5	20.5
$V_2$ (mL)	32	32.5	33
Concentración NaOH (M)	0.1		
Peso muestra (g)	0.25		

$V_1$ : primer punto de inflexión;  $V_2$ : segundo punto de inflexión

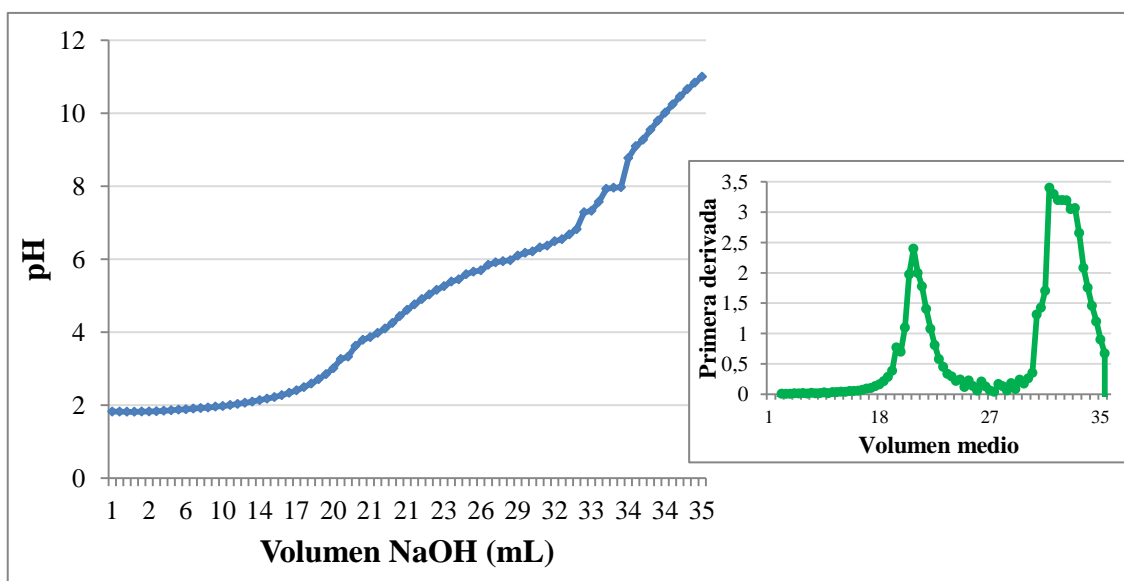


Figura 1.8: Curva de titulación potenciométrica y primera derivada.

Luego, con los resultados de la Tabla 1.4, se calculó el grado de desacetilación, obteniendo el siguiente resultado:  $DD = 83.72 \pm 3.22 \%$ .

De la misma manera, se realizó la titulación del quitosano de APM, arrojando el resultado de esta valoración un grado de desacetilación:  $DD = 86.25 \pm 0.47 \%$ .

Para el quitosano de BPM, se tomó el dato aportado por el fabricante,  $DD = 85\%$ .

La Tabla 1.3 muestra las características moleculares de los diferentes quitosanos utilizados. De acuerdo a estos resultados no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el grado de desacetilación de los diferentes productos comerciales disponibles.

### 1.3.1.2 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier

En la Figura 1.9, se pueden observar los espectros de absorción de IR obtenidos para los diferentes quitosanos estudiados.



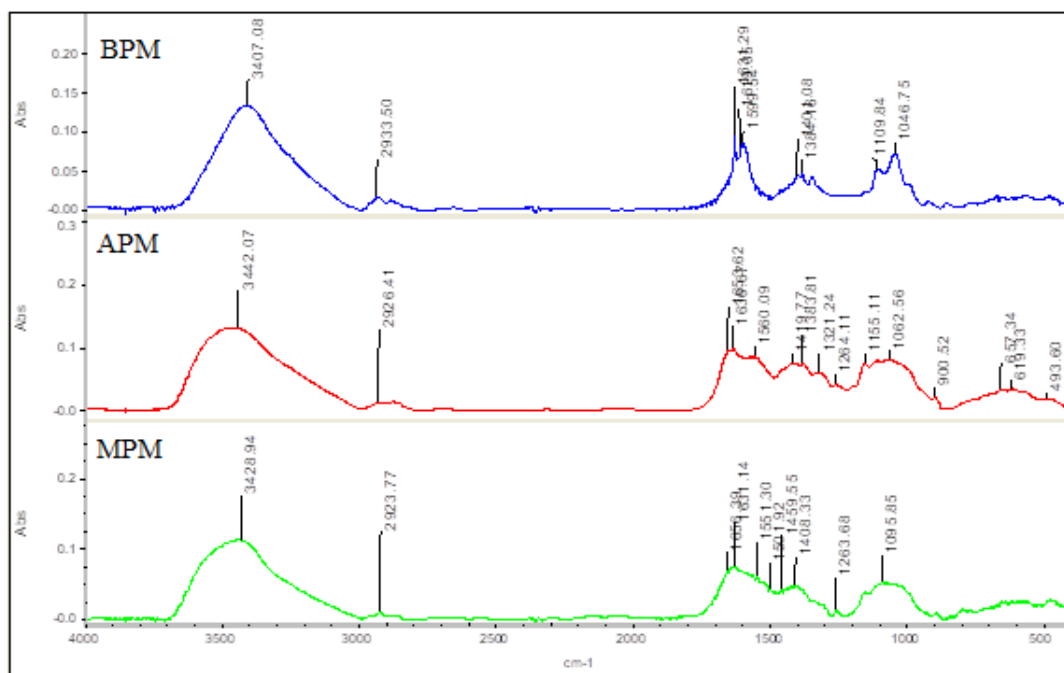


Figura 1.9: Espectros de absorción de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  obtenidos mediante espectroscopía de IR con transformada de Fourier para quitosano bajo peso molecular (BPM), quitosano peso molecular medio (MPM) y quitosano de alto peso molecular (APM).

En la Tabla 1.5 se muestran los grupos característicos del quitosano y el número de onda de absorción en el espectro.

Tabla 1.5: Grupos funcionales y longitud de onda característica en el espectro.

Grupo funcional	$\nu$ referencia ( $\text{cm}^{-1}$ )
Grupo -OH	3450
Grupo N-H	3292
Grupo C-H	2919 - 2862
Amida I	1655
Flexión del grupo -NH <sub>2</sub>	1580
Amida III	1313
Tensión asimétrica del C-O-C	1154
Vibraciones de la estructura piranósica	1082 - 1032
Tensión C-H de grupos anoméricos	896

A partir de los espectros de FTIR es posible tomar como banda característica la localizada

a  $1320\text{ cm}^{-1}$ , y como banda referencial la de  $1420\text{ cm}^{-1}$  (Brugnerotto y col., 2001) A partir de las intensidades de estas bandas características se puede calcular el grado de acetilación de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DA = 31.92 \times (A_{1320} - A_{1420}) - 12.20 \quad (1.11)$$

Por lo tanto, el grado de desacetilación, resulta:

$$DD = 100 - DA \quad (1.12)$$

Los resultados de DD obtenidos partir de este método se presentan en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6: Grados de acetilación y desacetilación de los quitosanos calculados mediante FTIR.

	BPM	MPM	APM
DA (%)	14,93	19,31	13,49
DD (%)	85,07	80,69	86,51

DA: Grado de acetilación; DD: Grado de desacetilación.  
 BPM: bajo peso molecular, MPM: peso molecular medio,  
 APM: alto peso molecular

Los valores calculados de DD a través de las medidas espectroscópicas son similares a los obtenidos anteriormente por titulación potenciométrica, sin registrarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los resultados obtenidos a través de ambos métodos.

Las modificaciones del procedimiento de extracción de quitosano produjeron quitosano con diferentes pesos moleculares y DD. Arancibia y col. (2015) enfatizaron que el DD fue sólo ligeramente afectado por las diferentes condiciones de procesamiento, mientras que se observó un efecto mayor en el  $M_n$ . Del mismo modo, Beaney y col. (2005) y Sini y col. (2007) obtuvieron quitosano de bajo peso molecular (70.3 y 256 kDa, respectivamente) a partir de quitina extraída por fermentación láctica de desechos de moluscos, señalando el efecto de material crudo. En este sentido, Martínez-Camacho y col. (2010) indicaron que la obtención de quitosano de bajo peso molecular podría atribuirse a una mayor susceptibilidad a la degradación de quitina y/o despolimerización durante la eliminación de proteínas y minerales, y en los procedimientos de purificación y posterior desacetilación.

### 1.3.2 Caracterización del almidón de maíz

#### 1.3.2.1 Determinación del contenido de amilosa y amilopectina

El almidón de maíz nativo presentó un peso molecular medio de  $2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$  para la amilosa y de  $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  para la amilopectina (Whistley & Daniel, 1984). Asimismo, mediante colorimetría se obtuvo un contenido de amilosa del 25%, resultado típico asociado al almidón de maíz.

#### 1.3.2.2 Caracterización por calorimetría diferencial de barrido

En la Tabla 1.7 se presentan los resultados obtenidos a partir del termograma para el almidón de maíz, correspondiente a la gelatinización del mismo. Los valores obtenidos corresponden a los típicamente informados para almidón de maíz por diversos autores (Tharanathan, 1995, García y col., 2000; Mali y col., 2004; Schwartz & Whistler, 2009).

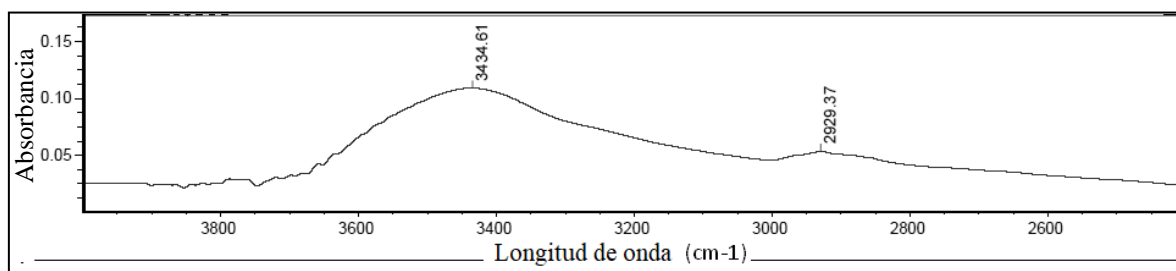
Tabla 1.7: Parámetros térmicos asociados a la gelatinización del almidón de maíz nativo.

$T_o$ (°C)	$T_p$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H$ (mJ/mg)
$67.95 \pm 0.56$	$72.16 \pm 0.14$	$76.88 \pm 0.34$	$11.43 \pm 0.15$

$T_o$ : temperatura de inicio de pico;  $T_p$ : temperatura de pico;  $T_f$ : temperatura de fin de pico;  $\Delta H$ : entalpía equivalente al área del pico.

#### 1.3.2.3 Espectroscopía de IR con transformada de Fourier

En las Figuras 1.10, se puede observar el espectro de infrarrojo para el almidón, en el cual se observan los picos característicos del polisacárido.



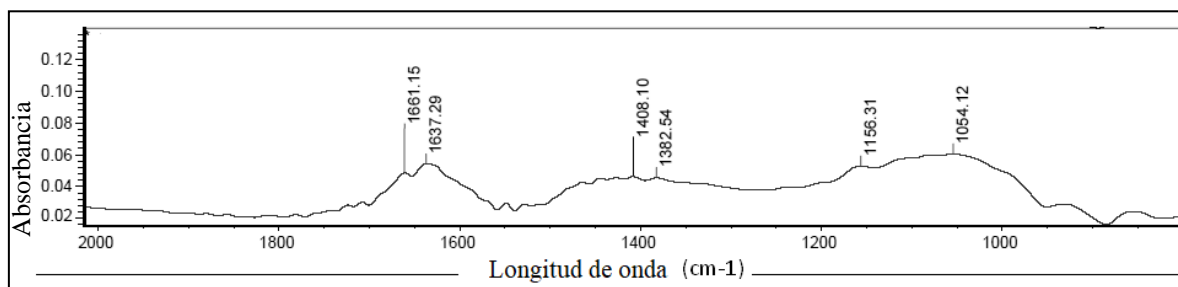


Figura 1.10: Espectros de infrarrojo para almidón de maíz nativo.

En la región conocida como la huella dactilar, que comprende 400 a 1250  $\text{cm}^{-1}$  (Olsen, 1990), se observan dos picos característicos, que se atribuyen al estiramiento del enlace C-O (Goheen & Wool, 1991). El pico localizado a 1408  $\text{cm}^{-1}$  es asignado a la flexión del grupo  $\text{CH}_2$ , mientras que el pico en 2929  $\text{cm}^{-1}$  es característico de los estiramientos C-H asociados con el anillo de glucopiranososa (Mano y col., 2003). La banda amplia desde 3000 a 3900  $\text{cm}^{-1}$  se debe al enlace de hidrógeno de los grupos hidroxilo que contribuyen a las vibraciones de los estiramientos asociados con el enlace libre inter e intramolecular del grupo hidroxilo, siendo una característica muy particular de la estructura del almidón (Fang y col., 2002).

#### **1.4 Conclusión**

Se determinaron las principales características del almidón y de los quitosanos utilizados. Además se pudo confirmar que existen diferencias en el peso molecular entre los quitosanos de los distintos proveedores, tal como se esperaba, si bien no se encontraron diferencias en sus grados de desacetilación.

La determinación de las características intrínsecas de los polímeros, es una etapa fundamental ya que las propiedades de los materiales que se formulen a partir de ellos, dependerán en gran medida de la estructura y del comportamiento propio de cada biopolímero.

### 1.5 Referencias bibliográficas

- Arancibia, M.Y., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-García, M., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2015). Antimicrobial and rheological properties of chitosan as affected by extracting conditions and humidity exposure. *LWT e Food Science and Technology*, 60, 802-810.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J. & Healy, M. (2005). Comparisons of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 145-150.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goyoolea, F.M., Argulles-Monal, W., Desbrieres, J. & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Cano, A.I., Cháfer, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2015). Physical and microstructural properties of biodegradable films based on pea starch and PVA. *Journal of Food Engineering*, 167, 59-64.
- Chen, G., Liu, B. & Zhang, B. (2014). Characterization of composite hydrocolloid film based on sodium cellulose sulfate and cassava starch. *Journal of Food Engineering*, 125, 105-111.
- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H. & Kim, C.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553–557.
- Crini, G., Guibal, E., Morcellt, M., Torri, G. & Badot, P. (2009). Chitine et Chitosane. Dubiopolymer a l'apliation, Presses universitaires de franche-comté, cap 1.
- Dutta, J., Tripathi, S. & Dutta, P.K. (2012). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, 18, 3-34.
- Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E. & Malcata, F.X. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, 1128–1134.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Tomkinson, J. & Hill, C.A.S. (2002). The preparation and characterization of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 47, 245-252.
- García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (1999). Edible starch films and coatings

- characterization: scanning electron microscopy, water vapor transmission and gas permeabilities. *Scanning*, 21, 348– 353.
- García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2000). Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52, 118– 124.
- Goheen, S.M., & Wool, R.P. (1991). Degradation of polyethylene-starch blends in soil. *Journal of Applied Polymer Science*, 42, 2691- 2701.
- Gortari, M.C. & Hours, R.A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1–14.
- Goy, R.C., Britto, D. & Assis, O.B.G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19 (3), 241-247. ISSN 0104-1428. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Harish Prashanth, K.V. & Tharanathan, R. (2007). Chitin/Chitosan: Modifications and their unlimited application potential - an overview. *Trends in Food Science & technology*, 18, 117-131.
- Jay-Lin, J. (2009). Capítulo 6: Structural features of starch granules II. In J. BeMiller and R. Whistler (eds.), *Starch Chemistry and Technology*, 3rd ed. Londres, Reino Unido. Elsevier, 193–236.
- Kandra, P., Challa, M.M. & Jyothi, H.K. (2012). Efficient use of shrimp waste: Present and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 17–29.
- Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H. & Yu, L.J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65, 197–202.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. & Park, H.J. (2010). Antimicrobial activity of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51 – 63.
- Kristl, J., Šmid-Korbar, J., Štruc, E., Schara, H. & Rupprecht, H. (1993). Hydrocolloids and gels of chitosan as drug carries. *International Journal of Pharmaceutics*, 99, 13-19.
- Lárez Velázquez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1, 15-21.
- Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4, 91-94.
- Leuba, J.L. & Stossel, P. (1985). Chitosan and other polyamines: antifungal activity and

- interaction with biological membranes. *Chitin in Nature and Technology*. Plenum Press, Nueva York, 215-223.
- Mali, S., Karam, L.B., Grossmann, M.V.E. & Ramos, L.P. (2004). Relationship among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 720–725.
- Mano, J.F., Koniarova, D., & Reis, R.L. (2003). Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14, 127-135.
- Mármol, Z., Gutiérrez, E., Páez, G., Ferrer, J. & Rincón, M. (2004). Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Revista Multiciencias*, 4, 91-95.
- Menegalli, F.C. (2017). Capítulo 7: Films and Coatings from Starch and Gums. En *Edible Films and Coatings - Fundamentals and Applications*. CRC Press, 125-142.
- Morrison, W.R & Laignelet, B. (1983). An Improved Colorimetric Procedure for Determining Apparent and Total Amylose in Cereal and Other Starches. *Journal of Cereal Science*, 1(1), 9-20.
- Móscicki, L., Mitrus, M., Wójtowicz, A., Oniszczyk, T., Rejak, A. & Janssen, L. (2012). Application of extrusion-cooking for processing of thermoplastic starch (TPS). *Food Research International*, 47, 291–299.
- Mourya, V.K. & Inamdar, N.N. (2008). Chitosan-Modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68, 1013-1051.
- Oliveira de Moraes, J., Scheibe, A.S., Sereno, A., Borges Laurindo, J. (2013). Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. *Journal of Food Engineering*, 119, 800-808.
- Olsen, E. D. (1990). *Métodos Ópticos de Análisis*. 3a ed. Editorial Reverté. México. Pp. 176-177.
- Painter, P.C. & Coleman, M.M. (1994). *Fundamentals of Polymer Science*. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, 433 pp., ISBN 1-56676-152-2.
- Pastor, A. & Higuera, I. (2004). Fuentes y Procesos. En: *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Fondo Editorial del Pontificia Universidad Católica del Perú. Ana Pastor Editora. Cap. 1, pág. 26.
- Rabea, E.I., Badawy M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G. & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.



- Raafat, D., Barga, K., Haas, A. & Sahl, H.G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antimicrobial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3764–3773.
- Raafat, D. & Sahl, H.G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential - a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2, 186–201.
- Ravi Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27.
- Roberts, G.A.F. & Domszy, J.G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4, 374-377.
- Schwartz, D. & Whistler, R.L. (2009). Capítulo 1: History and future of starch. En: J. BeMiller and R. Whistler (eds.), *Starch Chemistry and Technology*, 3rd ed. London, U.K.: Elsevier, pp. 1–10.
- Tharanathan, R.N. (1995). Starch - the polysaccharide of high abundance and usefulness. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 54, 452 –458.
- Tripathi, S., Mehrotra, G.K. & Dutta, P.K. (2008). Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications. *e-Polymers*, 8(1). doi:10.1515/epoly.2008.8.1.1082
- Van Soest, J.J.G., & Vliegthart, J.F.G. (1997). Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. *Trends in Biotechnology*, 15, 208 –213.
- Whistler, R.L. & Daniel, J.R. (1984). Molecular structure of starch. En: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. & Paschall, E.F. Editors. *Starch: Chemistry and Technology*. Nueva York, EEUU. Academic Press, pp. 154-180.
- Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources, structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133.

# CAPÍTULO 2

---

PELÍCULAS DE UN SOLO COMPONENTE Y PELÍCULAS  
COMPUESTAS

## **Capítulo 2. Películas de un solo componente y películas compuestas**

### **2.1 Introducción**

La formulación de películas y recubrimientos involucra el uso de al menos un componente capaz de formar una matriz continua y cohesiva, siendo éste un rasgo característico de los materiales poliméricos (Guilbert & Gontard, 2005). Las películas pueden ser homopoliméricas, si están constituidas por un solo tipo de polímero, o heteropoliméricas, si en cambio, están conformadas a partir de una mezcla de polímeros.

Los materiales utilizados para la obtención de películas comestibles comprenden polisacáridos, proteínas, lípidos y resinas, como ya se mencionó.

Los polisacáridos tienen tendencia a ser extremadamente bioactivos y generalmente son derivados de materias primas agrícolas o de desechos de la industria pesquera (Ramesh & Tharanathan, 2003). Estos polímeros presentan buenas propiedades de formación de películas en un amplio rango de viscosidades. Generalmente, los films constituidos por polisacáridos, se forman por ruptura de las interacciones entre segmentos de las cadenas del polímero durante la disolución, y posterior formación de nuevos enlaces intermoleculares que conllevan al desarrollo de una nueva matriz polimérica.

Las principales ventajas de las películas basadas en polisacáridos son su resistencia mecánica, su capacidad de barrera a aceites y lípidos, sus propiedades de barrera a los gases, y principalmente su permeabilidad selectiva al oxígeno. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, sus propiedades funcionales dependen fuertemente de la humedad a la que el material es expuesto (Lacroix & Cooksey, 2005).

Los films compuestos combinan polímeros con diferentes propiedades con el objetivo de mejorar las propiedades funcionales de los materiales finales. Algunas películas compuestas combinan hidrocoloides, como matriz estructural, con lípidos agregados en menor proporción, formando emulsiones estables o materiales bicapas (Mandal & Nandi, 2011).

#### **2.1.2 Métodos de obtención de las películas**

La obtención de las películas involucra pasar de una fase líquida a una fase sólida ordenada. Los cambios químicos y físicos que ocurren en este proceso de transformación son críticos en la apariencia final y propiedades del film.

Guilbert y Gontard (2005) clasificaron los métodos de obtención de películas en dos grandes procesos:

- a) El método de moldeo y deshidratación (*casting*) o proceso húmedo, que se basa en la dispersión del material en un solvente adecuado, y la consecuente evaporación del mismo. El proceso puede escalarse fácilmente (proceso de colada o *tape-casting*) permitiendo la obtención semicontinua de este tipo de materiales.
- b) Proceso seco, basado en las propiedades termoplásticas que presentan algunos materiales poliméricos cuando son sometidos a altas temperaturas y presiones, en procesos tales como la extrusión, inyección o la termocompresión.

### 2.1.3 Aplicaciones de las películas biodegradables en el envasado de alimentos: recopilación bibliográfica

Algunos polisacáridos utilizados para formular películas son el almidón, pectinas, alginato, quitosano, celulosa y sus derivados, entre otros (Vartiainen y col., 2014).

En la Tabla 2.1 se presenta una breve recopilación de aplicaciones de películas y recubrimientos a base de polisacáridos en alimentos, con especial énfasis en las formuladas a base de quitosano, almidón o la mezcla de ambos.

Tabla 2.1: Aplicaciones de películas y recubrimientos para conservación de alimentos

Matriz polimérica	Aplicación	Autor, año
Quitosano	Recubrimiento de mango mínimamente procesado para reducir pérdidas de peso e inhibir el desarrollo de mohos	Chien y col. (2007)
Almidón + quitosano + glicerol	Inhibir el crecimiento de microorganismos en zanahoria mínimamente procesada	Durango y col. (2006)
Quitosano	Reducir la pérdida de peso y el deterioro de las características sensoriales, e inhibir crecimiento de microorganismos de frutilla y frambuesas	Han y col. (2004)
Quitosano + aceite esencial de jengibre	Extender la vida útil de filetes de pescado en refrigeración.	Remya y col. (2017)
Alginato + goma gelano + glicerol	Reducir la tasa respiratoria y pérdidas de peso en papaya	Tapia y col. (2008)
Hidroxipropil celulosa + carboximetil celulosa + $\alpha$ -tocoferol	Preservar la calidad de nuez pecán por aplicación de recubrimiento	Baldwin & Wood (2006)
Quitosano	Recubrimiento de carne picada para mantener el color superficial y retardar la oxidación de lípidos	Suman y col. (2010)

El objetivo de este Capítulo es estudiar las propiedades de películas biodegradables de almidón de maíz y de quitosano, caracterizados previamente, como así también analizar las

propiedades de los materiales compuestos obtenidos con ambos polímeros en igual proporción.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Formulación de las suspensiones formadoras de films**

Se preparó una suspensión de almidón de maíz (AM) al 4% (p/p), que se gelatinizó durante 20 minutos a 85°C. Por otra parte, se disolvió quitosano (Q) en polvo de peso molecular medio (MPM) o de alto peso molecular (APM) en ácido acético 1.25% (p/p) para obtener soluciones de quitosano al 2.5% (p/p), las cuales se mantuvieron en agitación durante 24 horas. La solución de quitosano de bajo peso molecular (BPM) se utilizó directamente, tal cual se adquirió del proveedor.

Se analizaron las suspensiones de un componente (100% de AM o 100% de Q) así como la mezcla de ambas suspensiones en iguales proporciones (50:50).

En todas las formulaciones se añadió glicerol como plastificante en una concentración correspondiente al 25% p/p de sólidos; esta concentración se seleccionó a partir de pruebas preliminares realizadas.

Luego, se llevó a cabo la homogeneización de las suspensiones filmogénicas con un homogeneizador digital (Ultra Turrax, IKA T-25, Alemania) durante 1.5 min a 24000 rpm. Posteriormente, las suspensiones se trataron con una bomba de vacío durante 15 minutos para asegurar la eliminación de las burbujas de aire que podrían afectar las propiedades de las películas obtenidas.

### **2.2.2 Reología de las suspensiones formadoras de films**

El estudio del comportamiento reológico de las suspensiones filmogénicas permite determinar sus condiciones de procesamiento. Es importante destacar que la concentración de polímero en la formulación formadora de película es crítica, puesto que altas concentraciones de polímero conducen a soluciones de alta viscosidad que son difíciles de preparar, manipular y transportar. Por el contrario, mezclas de viscosidad excesivamente baja y las soluciones diluidas dan como resultado problemas asociados con la incapacidad para formar películas o recubrimientos que puedan adherirse a un producto o soporte específico. Además, el espesor de la película está determinado por la viscosidad de la suspensión filmogénica así como la relación de moldeo (peso de la suspensión filmogénica

en relación al área de la placa) cuando se obtienen mediante la técnica de *casting* o a escala semicontinua *tape-casting*. Las características reológicas también condicionan las propiedades estructurales de los materiales obtenidos tales como densidad, presencia de poros y grietas asociadas con la difícil eliminación de burbujas de soluciones altamente viscosas (Han & Gennadios, 2005). El desarrollo de una matriz densa sin defectos es necesario para obtener materiales con propiedades mecánicas y de barrera adecuadas.

En este contexto, los ensayos reológicos de las suspensiones formadoras de película se realizaron en un reómetro Rheo Stress 600 ThermoHaake (Haake, Alemania) utilizando una geometría plato-plato PP35 (Fig. 2.1), con una distancia de separación entre platos igual a 1 mm, a temperatura controlada (20°C) mediante un baño termostatzado.



Fig. 2.1: Geometría plato-plato utilizada para la caracterización reológica

### 2.2.2.1 Ensayos rotacionales

Los ensayos rotacionales brindan información sobre el comportamiento del flujo del fluido. Cuando un fluido es sometido a un sistema de fuerzas externas, representadas matemáticamente mediante el esfuerzo de corte o cizalladura ( $\tau$ ), se puede estudiar la relación existente entre este esfuerzo y su respuesta dinámica cuantificada, representada mediante la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ). De acuerdo a esta relación, puede establecerse una clasificación de los fluidos como se observa en la Figura 2.2.

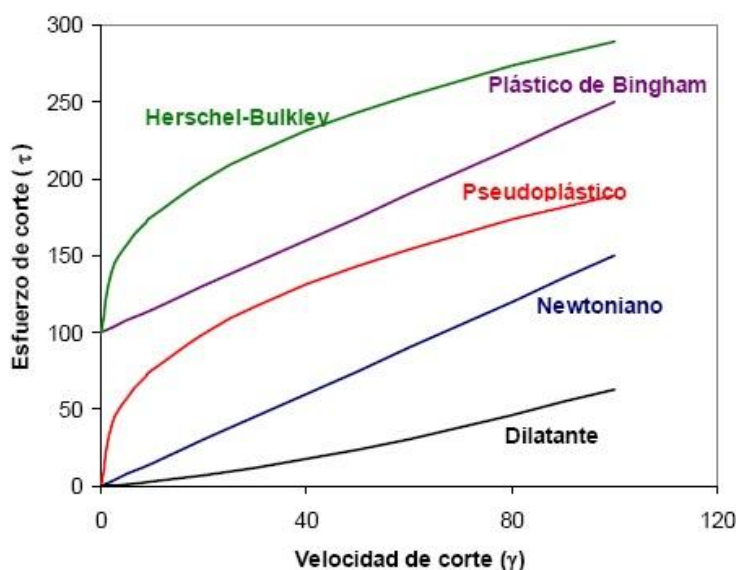


Fig. 2.2: Clasificación de comportamiento reológico de fluidos

Se realizaron ensayos rotacionales para estudiar el comportamiento del flujo de las muestras. A tal fin se registró el esfuerzo de corte variando la velocidad de deformación desde 0 hasta  $500 \text{ s}^{-1}$  durante 3 min, manteniendo a máxima velocidad durante 1 min y luego descendiendo con el mismo gradiente y tiempo. Para evaluar la dependencia con el tiempo se determinaron los índices de tixotropía, que corresponden al área de histéresis entre las curvas de flujo ascendente y descendente.

Las curvas resultantes fueron modeladas matemáticamente como fluidos de Ostwald de Waele de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad (2.1)$$

Donde:  $\tau$  es la tensión de cizalla,  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de cizallamiento,  $k$  es el coeficiente de consistencia, y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo. Por otra parte, la viscosidad aparente de las suspensiones filmogénicas se determinó a  $500 \text{ s}^{-1}$ . Se realizaron ensayos reológicos por triplicado para cada formulación.

Las curvas reológicas se analizaron con el software Haake Rheowin Data Manager versión 4.3.0.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.2.2 Ensayos oscilatorios

Los ensayos mecánicos dinámicos u oscilatorios permiten caracterizar las propiedades viscosas y elásticas del material, por lo que pueden aportar información adicional a los

ensayos rotacionales. En este tipo de experimentos la deformación aplicada varía sinusoidalmente con el tiempo de acuerdo con la expresión:

$$\gamma = \gamma^0 \sin \omega t \quad (2.2)$$

Mientras que el esfuerzo varía con la misma frecuencia  $\omega$ , pero presentando un desfase  $\delta$  con respecto a la deformación:

$$\sigma = \sigma^0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2.3)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones que describen el comportamiento de la deformación y el esfuerzo de cizalla, es posible desarrollar la ecuación constitutiva hasta llegar a la expresión:

$$\sigma = \gamma^0(G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t) \quad (2.4)$$

Se definen:  $G'(\omega)$  como el módulo de almacenamiento o elástico relacionado con la energía almacenada en el material, y  $G''(\omega)$  como el módulo de pérdidas o módulo viscoso relacionado con la energía disipada por el material, de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$G'(\omega) = \omega \int_0^\infty G(s) \sin \omega s \, ds \quad (2.5)$$

$$G''(\omega) = \omega \int_0^\infty G(s) \cos \omega s \, ds \quad (2.6)$$

Donde  $s = t - t'$ .

Desarrollando la ecuación (2.3), se obtiene la siguiente expresión:

$$\sigma = \sigma^0(\cos \delta \sin \omega t + \sin \delta \cos \omega t) \quad (2.7)$$

Comparando las ecuaciones (2.4) y (2.7), se obtiene:

$$G' = \frac{\sigma^0}{\gamma^0} \cos \delta \quad (2.8)$$

$$G'' = \frac{\sigma^0}{\gamma^0} \sin \delta \quad (2.9)$$

Por lo tanto, el módulo de almacenamiento o elástico es el cociente entre el esfuerzo que está en fase con la deformación y la deformación. Mientras que el módulo de disipación o viscoso es el cociente entre el esfuerzo desfazado  $\pi/2$  con la deformación y la deformación.

La tangente de pérdidas  $\tan \delta$  se define como:



$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2.10)$$

Donde  $\delta$  representa el desfase existente entre el esfuerzo y la deformación, siendo indicativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material.

Por lo tanto, en un material elástico, el esfuerzo y la deformación están en fase, y  $\delta = 0^\circ$ . En cambio, en un material viscoso, el esfuerzo y la deformación están desfasadas y  $\delta = 90^\circ$ . Mientras que en un material viscoelástico,  $\delta$  tomará valores entre 0 y  $90^\circ$ .

En la Figura 2.3, se muestra una curva típica obtenida en un ensayo oscilatorio para un polímero.

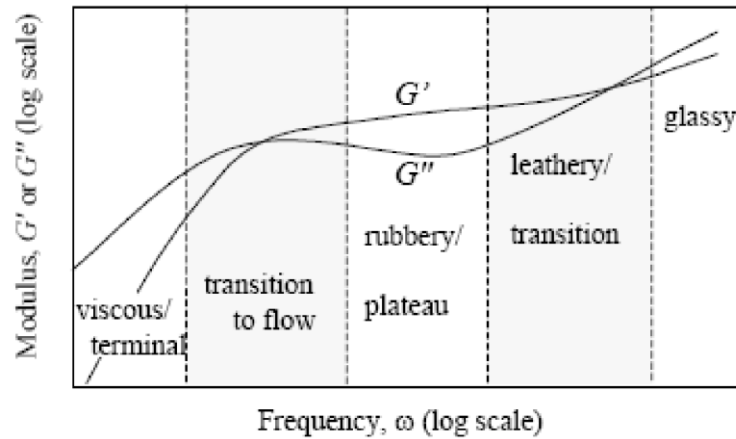


Fig. 2.3: Comportamiento típico de un polímero al realizar un barrido de frecuencias (Fuente: Barnes, H.A.; A Handbook of Elementary Rheology; University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Aberystwyth, 2000)

Se realizaron los siguientes ensayos dinámicos: barrido de frecuencias y barrido de esfuerzo. Los barridos de frecuencia (a esfuerzo constante) son normalmente empleados para la caracterización de materiales.

En primer lugar, se realizaron barridos de esfuerzo (0-20 Pa) a frecuencia constante (1 Hz) para determinar el rango de viscoelasticidad lineal (RVL) de las muestras. Luego se realizaron barridos de frecuencia (0.01 a 100 Hz) a un valor de esfuerzo constante. Los parámetros reológicos dinámicos registrados fueron el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ), la tangente del ángulo de desfase ( $\tan \delta = G''/G'$ ) y el módulo complejo del esfuerzo de corte ( $G^*$ ). También se obtuvieron los espectros mecánicos graficando  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia.

La influencia del tiempo sobre el comportamiento viscoelástico de las suspensiones filmogénicas (especialmente las que contenían almidón susceptibles de retrogradar) se evaluó a partir de ensayos reológicos en el modo dinámico de las suspensiones filmogénicas recién preparadas y luego del almacenamiento en condiciones de refrigeración durante 24 - 72 h.

Se realizaron ensayos reológicos por triplicado para cada formulación y las curvas reológicas se analizaron con el software Haake Rheowin Data Manager versión 4.3.0.0 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.2.3 Obtención de las películas

Las películas se obtuvieron por el método de casting. Como ya se mencionó anteriormente, este método involucra la eliminación del solvente, en este caso, agua. El espesor de las películas se define controlando la masa de solución filmogénica vertida en el molde.

Se utilizaron moldes de poliestireno (placas de petri) de 9 cm de diámetro. En estas placas se vertieron 15 g de las suspensiones.

Las placas se llevaron a estufa a 50°C y se dejaron secar hasta obtener un peso constante, es decir, hasta que no se produce más eliminación del disolvente.

Luego, se despegaron los films y se los colocó en desecadores a una humedad relativa constante de 60%, para su acondicionamiento, durante 5 días antes de realizar los ensayos (Fig. 2.4).

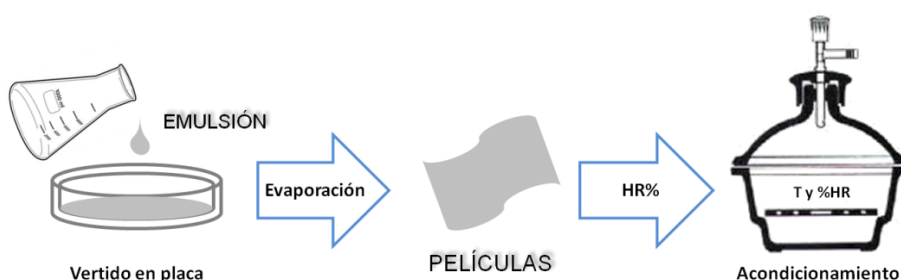


Fig. 2.4: Esquema del método de casting para obtención de películas

## 2.2.4 Propiedades de las películas

### 2.2.4.1 Contenido de humedad y espesor

El contenido de humedad de las películas se determinó midiendo la pérdida de peso de las mismas, al secarse en una estufa a 105°C hasta peso constante. Las muestras se analizaron por duplicado.

Por otra parte, el espesor de las películas se determinó utilizando un medidor de espesor de recubrimientos digital Check Line DCN-900 (Nueva York, EE.UU.) para materiales no conductores sobre sustratos no ferrosos. Se tomaron diez mediciones de cada muestra.

### 2.2.4.2 Permeabilidad al vapor de agua

En la Figura 2.5, se puede observar esquemáticamente cuáles son las posibles interacciones que ocurren entre un alimento, el entorno y el material de envase. Dentro de estas interacciones, se consideran los procesos de sorción, las migraciones hacia y desde el entorno y la permeabilidad a diversos componentes volátiles, tales como el O<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub>, el vapor de agua y los aromas, provenientes del entorno y del alimento.

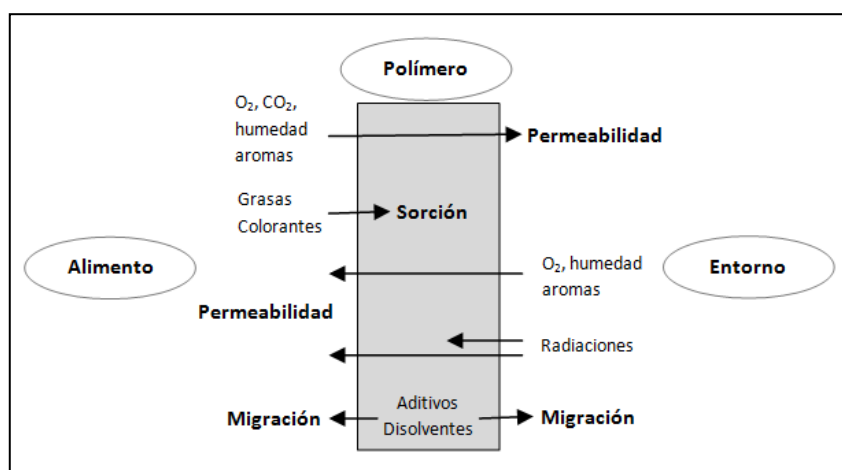


Fig. 2.5: Esquema de interacciones que ocurren entre un alimento, su envase y el entorno cuando se emplea un material polimérico para el envasado

En este ensayo, se estudiará la permeabilidad al vapor de agua (PVA) del material polimérico. Estas pruebas se realizaron usando el método ASTM E96 (ASTM, 2012) con varias modificaciones. Para realizar el ensayo, se utilizaron celdas de permeación de

aluminio (Payme Elcometer 5100, Manchester, Reino Unido). El sistema se armó de forma tal de tener una humedad relativa muy baja (0%) en contacto con un lado del film, y una humedad de 75.5% del otro lado de la película. Estas humedades se consiguieron colocando sílica gel seca en el interior de las copas o celdas, y luego disponiendo las copas ya armadas en desecadores cerrados que contenían una solución saturada de NaCl (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Humedades relativas conseguidas con soluciones saturadas de sales a 5°C.

Compuesto		$a_w$ a 5°C
Cloruro de Litio	CLi	0,11
Cloruro de magnesio	MgCl <sub>2</sub>	0,34
Carbonato de potasio	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,43
Nitrato de magnesio	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,59
Bromuro de sodio	NaBr	0,64
Ioduro de potasio	KI	0,73
Cloruro de sodio	NaCl	0,76
Cloruro de potasio	KCl	0,88

Las muestras de películas acondicionadas se dispusieron en las celdas como muestra la Fig. 2.6. Todo el sistema se colocó en condiciones de refrigeración. De esta forma, se mantuvo un gradiente constante de presión parcial de vapor de agua a través de las películas de 2000 Pa a 5°C. La temperatura del ensayo se seleccionó considerando que a partir de las películas se obtendrían envases para la conservación de arándanos en condiciones de refrigeración.

Una vez alcanzada la condición de estado estacionario, se pesaron las celdas de permeación, con precisión de 0.0001 g, en el momento inicial y a intervalos de 1 h, durante 8 h. Las variaciones del peso de las celdas se determinaron en función del tiempo en una balanza analítica. Los resultados se regresionaron linealmente y la pendiente permitió calcular la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA, en  $\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ); considerando

el espesor ensayado en la película se calculó el PVA (g / m s Pa). Los valores informados corresponden a la media de al menos dos determinaciones.



Fig. 2.6: Celdas de permeación utilizadas para determinación de la permeabilidad al vapor de agua de películas

#### 2.2.4.2 Solubilidad

La solubilidad de las películas en agua a 25°C se determinó de acuerdo con el método descrito por López y col. (2008). Para realizar el ensayo, los films acondicionados se cortaron en cuadrados de 2x2 cm<sup>2</sup>. Se registró el peso inicial de cada muestra en una balanza analítica con precisión 0.0001 g. Con el contenido de humedad de las películas, se calculó la masa seca inicial ( $m_{si}$ ). Luego, se colocaron en vasos de precipitado con 80 mL de agua destilada a 20°C y se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm durante 1 h. Una vez transcurrido este tiempo, se extrajeron las muestras, se colocaron en placas y se llevaron a estufa a 105°C, hasta obtener peso constante. Finalmente, se registró el peso final de las muestras (masa seca final,  $m_{sf}$ ).

El porcentaje de solubilidad de las muestras se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%Solubilidad = \frac{(m_{si} - m_{sf})}{m_{si}} \times 100 \quad (2.11)$$

Los resultados informados correspondieron a la media de al menos dos ensayos de repetición.

### 2.2.4.3 Análisis dinámico mecánico (DMA)

#### 2.2.4.3.1 Barrido de frecuencias

Se realizaron análisis dinámicos mecánicos (DMA) en un equipo Q800 (TA Instruments, New Castle, EUA) con un sistema de refrigeración de N<sub>2</sub> líquido, utilizando un sistema de mordazas de tensión y muestras rectangulares de películas (30 x 6 mm<sup>2</sup>). Para seleccionar el rango de viscoelasticidad lineal para los barridos de frecuencia, se realizó un barrido de amplitud de 1 a 20 µm a frecuencia fija (5 Hz). Se llevaron a cabo barridos multifrecuencia (3-20 Hz) con amplitud fija (5 µm) de -100 a 150°C a 5°C min<sup>-1</sup>, con una isoterma de 5 min a -100°C. Se registraron y analizaron las curvas del módulo de almacenamiento o módulo elástico (E'), del módulo de pérdida o módulo viscoso (E''), y de la tangente de desfase (tan δ = E''/E') en función de la temperatura utilizando el software Universal Analysis 2000 (TA Instruments, New Castle, EE.UU.). Se analizaron 3 repeticiones de cada muestra. Las temperaturas de los procesos de relajación asociados con las temperaturas de transición vítrea se determinaron a través del punto de inflexión de la curva del módulo elástico E' así como el pico máximo tanto en las curvas de módulo viscoso E'' y de tan δ.

#### 2.2.4.3.2 Barrido de esfuerzo

Para el ensayo cuasiestático en estado uniaxial, se aplicó una velocidad de rampa de fuerza constante de 0.3 N min<sup>-1</sup> para registrar las curvas tensión-deformación hasta ruptura de las muestras o hasta 18 N, usando el mismo equipo DMA que en el caso del barrido de frecuencias. Las pruebas se realizaron a 25°C. El módulo elástico dinámico (E<sub>c</sub>, MPa) de las muestras de película se determinó mediante el modelado matemático de las curvas tensión-deformación obtenidas por DMA, de acuerdo con el modelo utilizado por Chillo y col. (2008) (Ec. 2.13):

$$\sigma_{\tau} = E_c \times \varepsilon_{\tau} \times e^{(-\varepsilon_{\tau} \times K)} \quad (2.13)$$

Donde  $\sigma_{\tau}$  y  $\varepsilon_{\tau}$  son la tensión y el estrés verdaderos, respectivamente, calculados de acuerdo con Mancini y col. (1999); y K es un valor constante, considerado como un parámetro de ajuste. Los resultados informados corresponden a la media de cinco determinaciones.

#### 2.2.4.4 Espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier

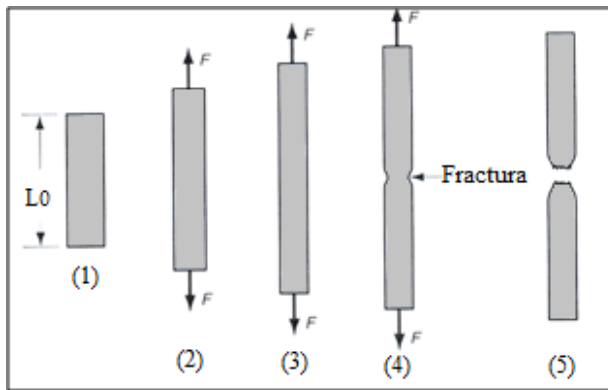
Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas se realizaron en un espectrofotómetro de infrarrojos (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, EEUU). Para ello, las muestras de películas de un solo componente y películas compuestas se criofracturaron poniéndolas en contacto con  $N_2$  líquido y se molieron en un molino de ágata hasta obtener un polvo fino (Fig. 2.7). Luego, con el polvo obtenido se prepararon pastillas con KBr de calidad espectroscópica por compresión, las cuales se analizaron en el equipo. Se registraron espectros entre  $4000$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  por acumulación de 64 exploraciones a  $4\text{ cm}^{-1}$ . Los datos se analizaron utilizando el software Omnic 8.3 (Thermo Scientific, Madison, EE.UU.).



Fig. 2.7: Preparación de las muestras para analizar en espectrofotómetro FTIR (polvo obtenido a partir de las películas)

### 2.2.4.5 Propiedades mecánicas

Se estudiaron las propiedades mecánicas de las películas mediante ensayos de tracción, en los cuales a través de la aplicación de una fuerza se produce la elongación del material y éste tiende a reducir su espesor, es decir, a reducir su área en la sección transversal (Fig. 2.8).



- (1) Inicio del ensayo, no hay carga
- (2) Elongación uniforme y reducción del área de la sección transversal
- (3) Se alcanza la carga máxima
- (4) Se inicia la formación del cuello, la carga comienza a decrecer
- (5) Fractura

Fig. 2.8: Progreso típico de la probeta en un ensayo de tracción.

Cuando el material es sometido a un esfuerzo o tensión se puede llegar a la ruptura del mismo, que ocurre cuando la tensión de tracción supera valores límites característicos para cada material. El aspecto de la superficie de ruptura puede ser muy diferente. En algunos casos, esta superficie presenta aristas vivas, cráteres y grietas diminutas; las deformaciones transversales son reducidas y la fluencia longitudinal también. Este tipo de ruptura se denomina frágil y es característica de algunos polímeros (poliestireno, polimetacrilato de metilo, etc.). En cambio, en otros polímeros se da una ruptura que se produce tras grandes alargamientos, que ponen de manifiesto una prolongada fluencia del material. En este caso, las deformaciones transversales son grandes, con formación de cuellos alargados. Este tipo de ruptura se denomina dúctil y es característica del polietileno de baja densidad (Fig. 2.9). Cualquier polímero puede presentar ruptura frágil o dúctil dependiendo de la temperatura, la evolución de la tensión en el tiempo y la frecuencia. A temperaturas por debajo de la transición vítrea ( $T_g$ ), todos los polímeros presentan ruptura frágil; mientras que a temperaturas más altas se favorece la ruptura dúctil. La presencia de plastificantes, que reducen la  $T_g$ , también induce a ruptura dúctil.

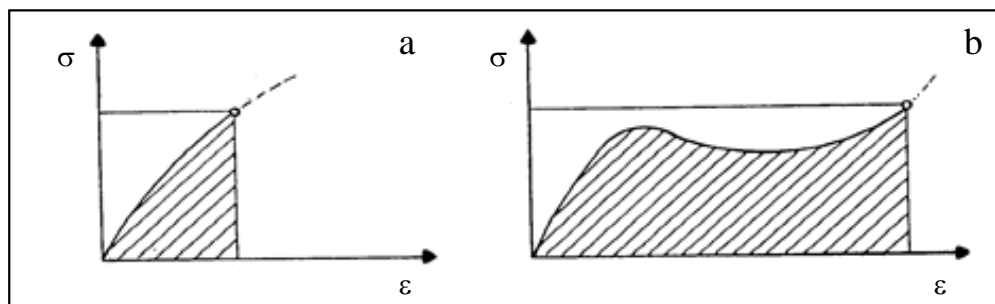


Fig. 2.9: Curva de esfuerzo vs. deformación típica de materiales a) frágiles y b) dúctiles o flexibles



Del mismo modo, se puede encontrar una clasificación del comportamiento de los materiales como se muestra en la Figura 2.10.

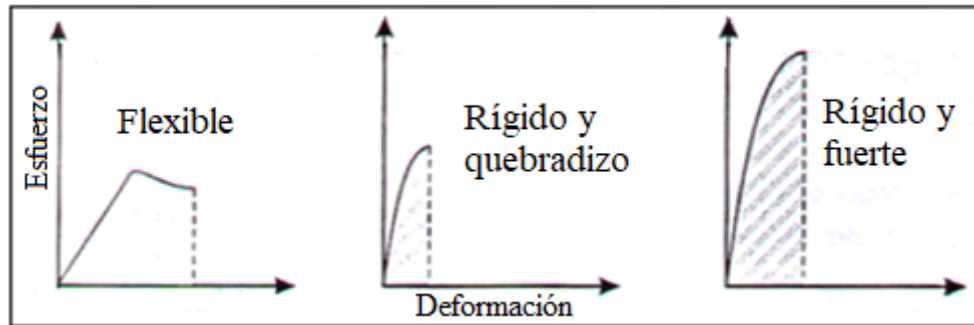


Fig. 2.10: Patrones de comportamiento mecánico a la tracción para distintos materiales

A lo largo del ensayo de tracción, se va registrando el esfuerzo en función de la deformación del material. Ambos parámetros pueden definirse en función de la longitud y área originales de las muestras, de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad (2.14)$$

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} \quad (2.15)$$

Donde  $\sigma$  y  $\varepsilon$  son el esfuerzo y deformación ingenieriles.

Ahora bien, puede definirse la deformación real, teniendo en cuenta que el área se reduce a medida que avanza el ensayo (Ec. 2.16).

$$\varepsilon = \int_{L_0}^L \frac{dL}{L} = \ln \frac{L}{L_0} \quad (2.16)$$

El perfil mecánico, es decir la curva de esfuerzo-deformación, típico para este tipo de materiales se representan en las Fig. 2.11 y 2.12. En la primera gráfica se observa la curva proyectada si no hubiese ocurrido el cuello o estrechamiento de la probeta.

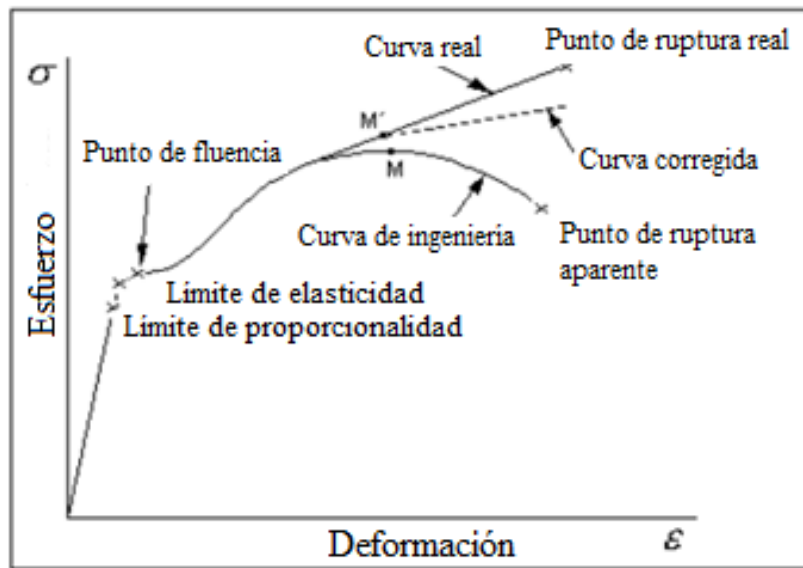


Fig. 2.11: Perfil mecánico, esfuerzo ( $\sigma$ ) vs. deformación ( $\epsilon$ ), comparando el comportamiento real y el comportamiento si no se hubiese producido el cuello.

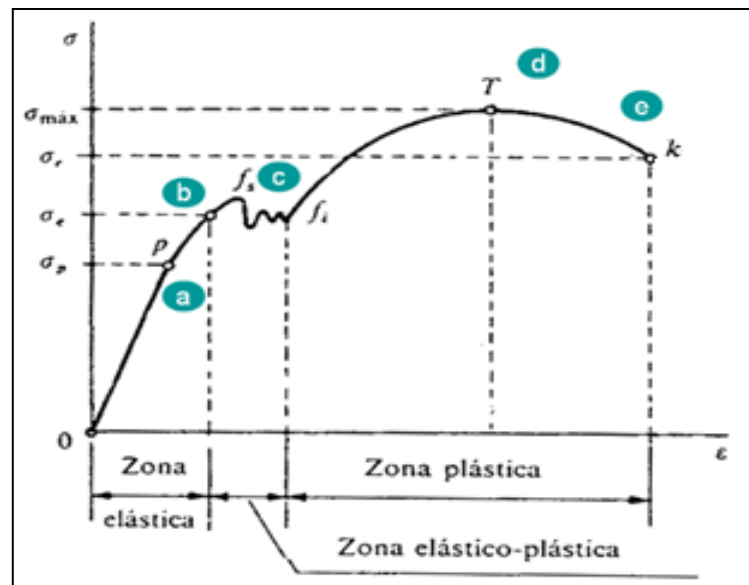


Fig. 2.12: Gráfico esfuerzo ( $\sigma$ ) vs deformación ( $\epsilon$ ) para materiales dúctiles

Analizando el perfil mecánico ilustrado en la Fig. 2.12 se observan los siguientes eventos:

(a) Límite de proporcionalidad: es el segmento recto de la curva que va desde el inicio del ensayo hasta un punto llamado límite de proporcionalidad. En esta porción puede aplicarse la ley de Hooke y por esta razón esta región se denomina zona elástica.

(b) Límite de elasticidad o límite lineal: el material no recupera completamente su forma al ser descargado.

- (c) Punto de fluencia: en este punto aparece un alargamiento o fluencia del material sin el correspondiente aumento de carga.
- (d) Esfuerzo máximo: corresponde al valor máximo del esfuerzo. En este punto se inicia el cuello de la probeta.
- (e) Esfuerzo de ruptura: esfuerzo generado en el material durante su ruptura.

El ensayo de tracción uniaxial se realiza en un texturómetro o máquina universal de textura. En este caso se empleó el texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra) con un sistema de mordazas de tensión A/TG (Fig. 2.13). Se cortaron muestras con forma rectangular de 6 cm de longitud y 0.7 cm de ancho a partir de películas acondicionadas. El equipo se programó para realizar un ensayo de medida de fuerza en tensión; se trabajó a una velocidad de ensayo de 1 mm/s, y se programó el equipo para que recorra una distancia suficiente para producir la ruptura de las muestras. Se ensayaron al menos diez probetas para cada formulación de película.



Fig. 2.13: Sistema de mordazas utilizado para los ensayos de resistencia a la tracción de las películas

Durante el ensayo se va registrando la fuerza en función de la deformación, y a partir de la curva registrada pueden obtenerse los siguientes parámetros (López y col., 2011):

- Fuerza de ruptura (N)
- Deformación a la ruptura (mm): extensión al momento de la ruptura

- o Porcentaje de elongación a la ruptura (EB por sus siglas en inglés, %): se calcula como la deformación a la ruptura dividido por la longitud inicial de la probeta
- o Esfuerzo de tensión (TS por sus siglas en inglés, MPa): se obtiene dividiendo la fuerza a la ruptura por la sección de la muestra
- o Módulo de elasticidad o de Young (EM por sus siglas en inglés, MPa): calculado como la pendiente en la primera porción de la curva, es decir, en la zona de comportamiento elástico.

### 2.2.4.6 Color

El color de la superficie de las películas se midió utilizando un colorímetro (CR-300 Minolta, Japón), previamente calibrado con una placa estándar blanca ( $Y = 93,2$ ,  $x = 0.3133$  e  $y = 0.3192$ ). Se utilizó la escala de color CIELAB, donde  $L$  es la luminosidad,  $a^*$  es el componente verde-rojo de las muestras y  $b^*$  es el componente azul-amarillo. Se colocaron muestras de película sobre la placa blanca, y se tomaron al menos cinco mediciones de las superficies de la muestra (Fig. 2.15).

Las diferencias de color ( $\Delta E$ ) se calcularon como:

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2 + (L - L_0)^2} \quad (2.17)$$

Donde  $a_0^*$ ,  $b_0^*$  y  $L_0$  son los parámetros del estándar y  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L$  son los parámetros de la muestra.



Fig. 2.14: Medición de color de films con colorímetro triestímulo

### 2.2.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el software Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD) a través del análisis de varianza (ANOVA). Se realizó la comparación de medias utilizando el test de diferencias mínimas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%.

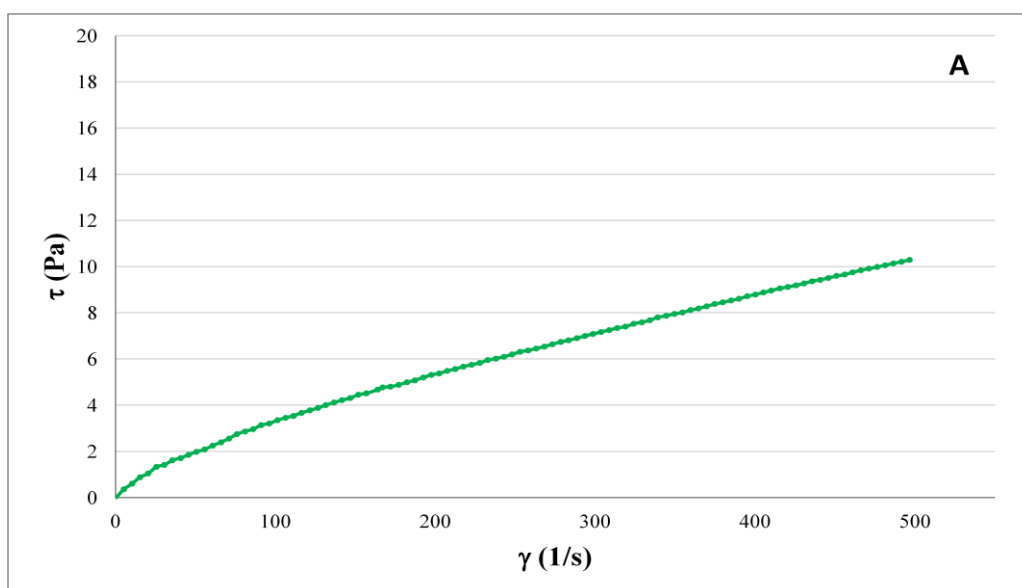
## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Reología de las suspensiones formadoras de film

#### 2.3.1.1 Análisis para películas de un solo componente

Los ensayos rotacionales permitieron analizar el comportamiento reológico de las suspensiones filmogénicas cuando se sometieron a condiciones cercanas a los parámetros de procesamiento industrial tales como un alto esfuerzo cortante.

En la Fig. 2.15 se muestran las curvas de esfuerzo de corte ( $\tau$ , Pa) en función de la velocidad de rotación ( $\dot{\gamma}$ , 1/s), en donde se puede observar el comportamiento de flujo de la suspensión de almidón de maíz gelatinizada (Fig. 2.15A) y del quitosano BPM y MPM (Fig. 2.15B). La selección de las curvas reológicas correspondientes a estos dos tipos de quitosano se basó en que presentan un comportamiento reológico diferente. El tipo de comportamiento reológico del quitosano de alto peso molecular APM, fue similar al del MPM por lo que la curva correspondiente se excluyó de la Fig. 2.15.



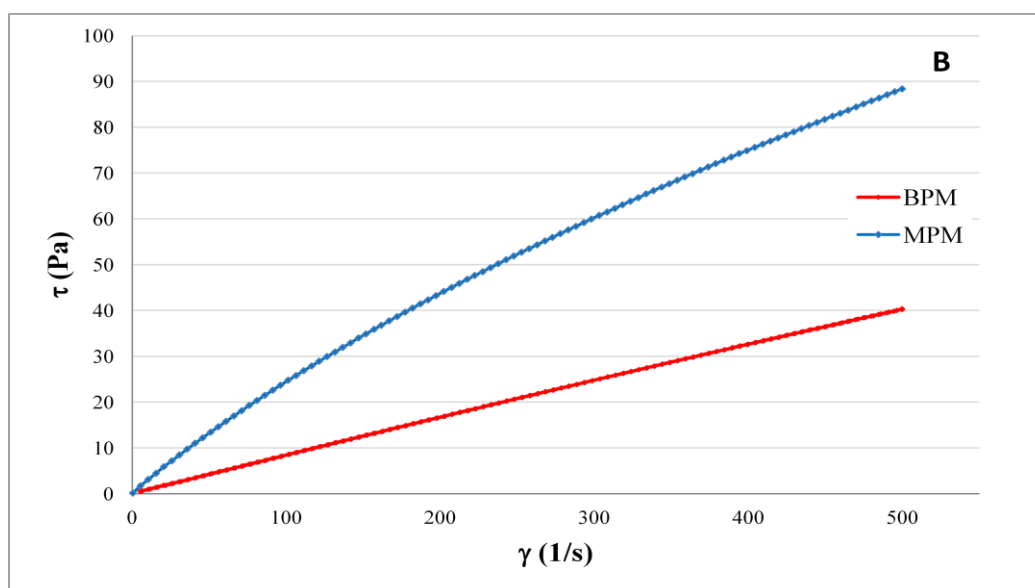


Fig. 2.15: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo  $\tau$  (Pa) en función de la velocidad de rotación  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ), para: (A) suspensión de almidón gelatinizada; (B) soluciones de quitosano de distinto peso molecular

La suspensión filmogénica de almidón de maíz mostró un comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ), que fue ajustado satisfactoriamente por el modelo de Ostwald de Waele (Tabla 2.3). El comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas de quitosano dependió de su peso molecular. Mientras que la solución de quitosano BPM presentó un comportamiento prácticamente newtoniano ( $n = 0.96$ ), las soluciones de quitosano MPM y APM dieron como resultado un comportamiento pseudoplástico, incrementando tanto el índice de consistencia como la viscosidad aparente y consecuentemente disminuyendo el índice de comportamiento del flujo con el peso molecular del polímero. La viscosidad aparente de las soluciones de Q fue mayor que la de las suspensiones de almidón de maíz, siendo 2.4, 5.3 y 7.8 veces mayores para BPM, MPM y APM, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que los aspectos estructurales de las macromoléculas, tales como el peso molecular así como el grado de polimerización y la distribución del tamaño de las cadenas, determinan las características hidrodinámicas de las soluciones filmogénicas. Cassetari y col. (2013) enfatizaron que diferentes mecanismos moleculares (por ejemplo, enlaces puente de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) están implicados en el comportamiento reológico de los sistemas a base de quitosano.

Tabla 2.3: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de distinto peso molecular

Polímero base de la suspensión filmogénica	Modelo matemático de Ostwald de Waele			Viscosidad aparente a 500 s <sup>-1</sup> (mPa s)
	r <sup>2</sup>	Índice de consistencia k (Pa s <sup>-n</sup> )	Índice de comportamiento n (s <sup>n</sup> )	
A	0.9783	0.365 ± 0.007 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>c</sup>	32.89 ± 2.4 <sup>d</sup>
BPM	0.9999	0.10 ± 0.003 <sup>d</sup>	0.96 ± 0.005 <sup>a</sup>	80.52 ± 0.05 <sup>c</sup>
MPM	0.9997	0.62 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>b</sup>	174.46 ± 2.80 <sup>b</sup>
APM	0.9990	3.19 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.605 ± 0.005 <sup>c</sup>	255.57 ± 11.12 <sup>a</sup>

A: Almidón de maíz; BPM: quitosano de bajo peso molecular; MPM: quitosano de peso molecular medio; APM: quitosano de alto peso molecular. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.1.2 Efecto del glicerol

Se estudió el efecto de la incorporación de glicerol (agente plastificante) en el comportamiento de flujo de las suspensiones de polímeros. Para ello se realizaron los ensayos rotacionales de suspensiones de almidón con y sin el agregado de glicerol en la formulación. De la misma forma, se prepararon soluciones de quitosano con y sin el agregado de glicerol. En este punto, se escogió el quitosano de alto peso molecular (APM), que al presentar mayor viscosidad que los otros quitosanos disponibles, se espera que tenga un efecto más pronunciado con el agregado de glicerol que en el caso del quitosano MPM o BPM.

La Figura 2.16 muestra las curvas de comportamiento de flujo obtenidas para las suspensiones filmogénicas a base de almidón de maíz. Como puede observarse, el agregado de glicerol disminuyó la tixotropía, es decir, el área comprendida entre la curva de ascenso y la de descenso.

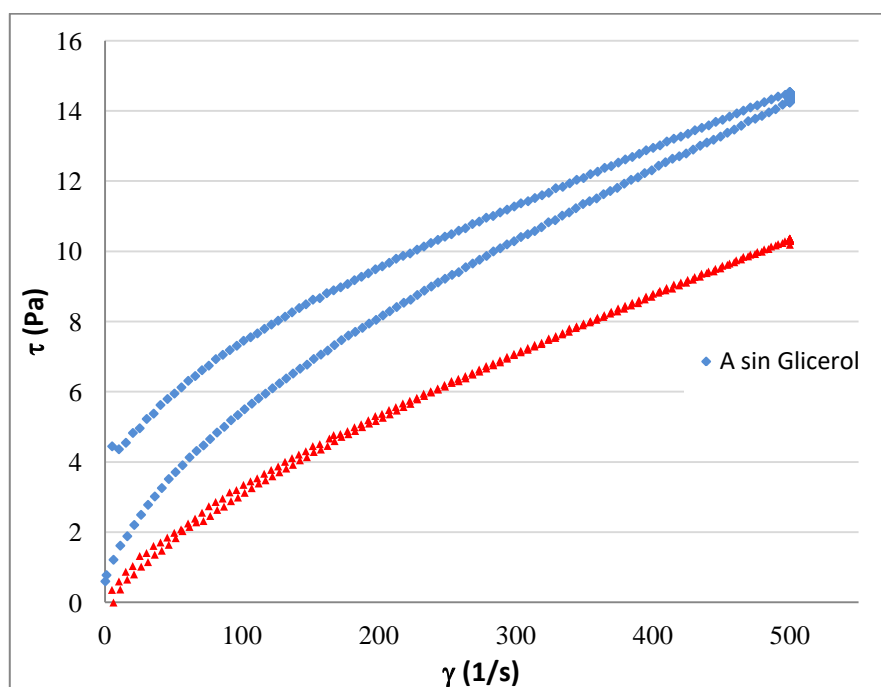


Fig. 2.16: Curva de comportamiento de flujo para suspensiones filmogénicas a base de almidón con y sin glicerol.

En la Tabla 2.4, se encuentran los resultados del modelado matemático aplicando el modelo de Ostwald de Waele y la viscosidad aparente tomada a una velocidad de rotación de  $500 \text{ s}^{-1}$ . Las muestras se ajustaron satisfactoriamente al modelo matemático ( $r^2 > 0.97$ ).

Tabla 2.4: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de bajo peso molecular con y sin el agregado de glicerol

Suspensión de polímero	Modelo matemático de Ostwald de Waele			Viscosidad aparente a $500 \text{ s}^{-1}$ (mPa s)
	$r^2$	Índice de consistencia k ( $\text{Pa s}^{-n}$ )	Índice de comportamiento de flujo n ( $\text{s}^n$ )	
A sin G	0.9783	$0.365 \pm 0.007^c$	$0.63 \pm 0.04^a$	$32.89 \pm 2.4^b$
A con G	0.9923	$1.351 \pm 0.128^b$	$0.381 \pm 0.008^b$	$29.61 \pm 0.19^c$
Q APM sin G	0.9990	$3.19 \pm 0.08^a$	$0.605 \pm 0.005^a$	$255.57 \pm 11.12^a$
Q APM con G	0.9999	$3.00 \pm 0.14^a$	$0.607 \pm 0.0004^a$	$256.06 \pm 12.79^a$

A: Almidón de maíz; BPM: quitosano de bajo peso molecular; G: glicerol. Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



Como puede observarse en la Tabla 2.4 la viscosidad aparente de la suspensión de almidón disminuyó ligeramente con el agregado de glicerol. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los parámetros reológicos de las SFFs a base de quitosano con y sin plastificante.

### 3.3.2 Efecto del tiempo de almacenamiento de las suspensiones filmogénicas

En la Figura 2.17, se pueden observar las curvas de comportamiento de flujo obtenidas para las suspensiones de almidón de maíz recién preparadas ( $t = 0$  h) y luego de 24 h ( $t = 24$  h), que permitieron estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento, es decir, el efecto de la retrogradación del almidón. Las curvas superiores corresponden a la rampa ascendente de velocidad rotacional (de 0 a  $500 \text{ s}^{-1}$ ), mientras que las inferiores a la rampa descendente (de  $500$  a  $0 \text{ s}^{-1}$ ).

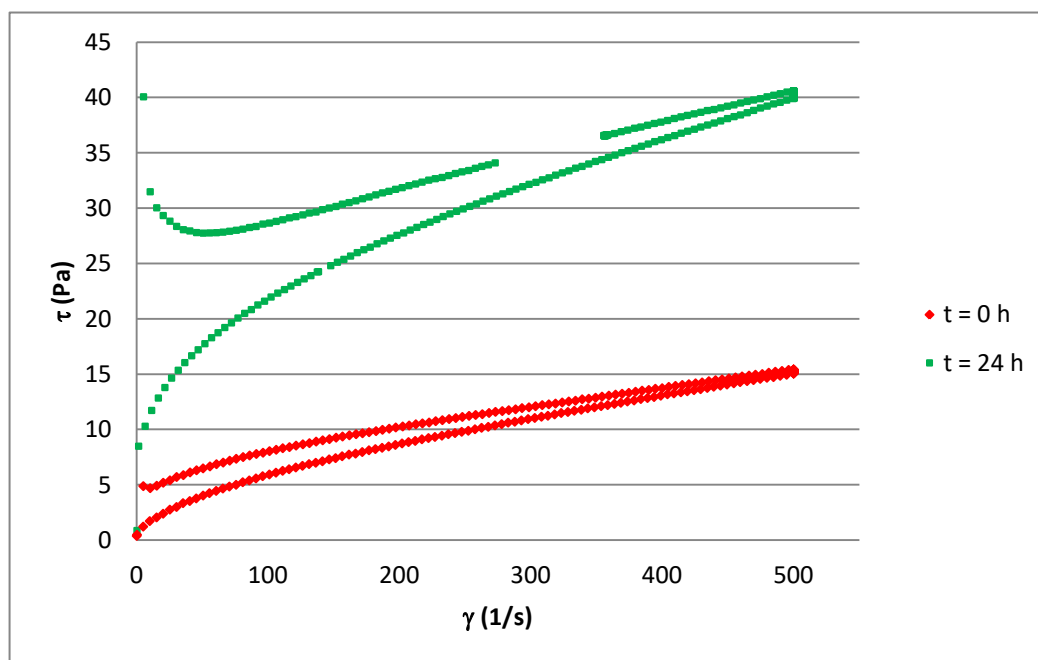


Fig. 2.17: Curvas de comportamiento de flujo para suspensiones filmogénicas de almidón de maíz a tiempo 0 y luego de 24 h de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Como puede observarse, el tiempo de almacenamiento aumentó la tixotropía de las suspensiones (mayor área entre las curvas ascendente y descendente) debido al reordenamiento de las cadenas poliméricas que se produce durante la retrogradación de amilosa a corto plazo y luego de las de amilopectina.

En los ensayos dinámicos u oscilatorios de barrido de frecuencia para las suspensiones de AM sin glicerol, se observó que  $G' > G''$  (Fig. 2.18), es decir, que predominó el comportamiento elástico o sólido a bajas frecuencias.

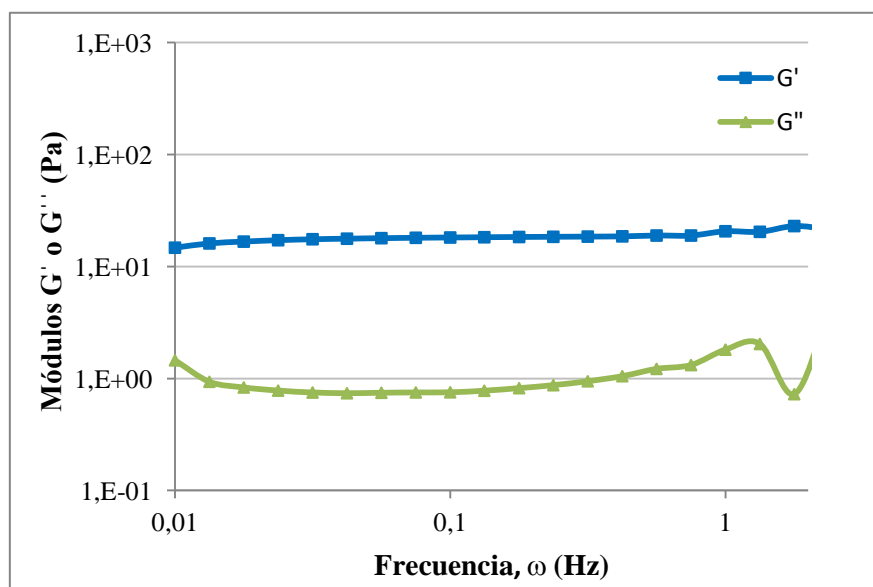


Fig. 2.18: Evolución de los módulos  $G'$  o  $G''$  para una suspensión filmogénica de almidón de maíz sin glicerol

En las tablas que se presentan a continuación, se muestra la evolución de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ), a lo largo del tiempo de almacenamiento para la suspensión de almidón sin (Tabla 2.5), y con agregado de glicerol (Tabla 2.6).

Tabla 2.5: Valores de los módulos elástico y viscoso a 1 Hz para suspensión filmogénica de almidón de maíz almacenado a distintos tiempos

Tiempo de almacenamiento (h)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
0	18.99	1.347
24	51.41	3.574
72	94.11	7.047

$G'$ : módulo elástico;  $G''$ : módulo viscoso

En el caso de la suspensión de almidón con glicerol, se observó que a bajas frecuencias predominó el comportamiento elástico,  $G' > G''$ , y esto se repitió para los tiempos de almacenamiento analizados.

Tabla 2.6: Valores de los módulos elástico y viscoso a 1 Hz para suspensión filmogénica de almidón de maíz con glicerol almacenado a distintos tiempos

Tiempo de almacenamiento (h)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
0	0.65	0.83
24	40.90	2.65
72	67.88	4.99

$G'$ : módulo elástico;  $G''$ : módulo viscoso

## 2.3.2 Propiedades de las películas

### 2.3.2.1 Espesor y humedad

El espesor y la humedad de las películas se presentan en la Tabla 2.7. En las películas de quitosano, el peso molecular del polímero no afectó el espesor. En cambio para las películas compuestas, cuanto mayor es el peso molecular, mayor es el espesor; aunque las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ) sólo en el caso de películas basadas en BPM y APM. Las películas de almidón de maíz presentaron espesores de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ .

La comparación del espesor de película con los reportados para films basados en hidrocoloides es difícil de realizar debido a que generalmente se omite la relación de moldeo utilizada.

Tabla 2.7: Espesor y humedad de películas a base de almidón, quitosano y la mezcla de ambos

Película	Tipo de Quitosano	Espesor de película (μm)	Contenido de humedad (%)
AM	-	80.72 ± 2.15 <sup>b</sup>	14.60 ± 0.73 <sup>a</sup>
50:50	BPM	66.17 ± 2.76 <sup>a</sup>	21.81 ± 0.15 <sup>b</sup>
	MPM	72.94 ± 7.27 <sup>a,b</sup>	26.75 ± 0.73 <sup>c</sup>
	APM	82.00 ± 2.98 <sup>b,c</sup>	13.95 ± 0.51 <sup>a</sup>
Q	BPM	77.72 ± 6.67 <sup>b</sup>	31.60 ± 0.88 <sup>d</sup>
	MPM	86.22 ± 2.34 <sup>b,c</sup>	23.41 ± 1.12 <sup>b,c</sup>
	APM	88.38 ± 7.86 <sup>b,c</sup>	14.97 ± 0.86 <sup>a</sup>

A: Almidón de maíz; BPM: quitosano de bajo peso molecular; G: glicerol. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.2.1 Permeabilidad al vapor de agua

Las películas de almidón de maíz presentaron un valor de permeabilidad al vapor de agua (PVA) de  $1.96 \pm 0.27 \times 10^{-10}$  g/m s Pa, lo cual se encuentra dentro del rango de los valores reportados para otras películas de almidón de maíz (López y col., 2008; García y col., 2009).

Las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas de quitosano dependieron del peso molecular del polímero utilizado. Los valores de PVA obtenidos fueron:  $4.14 \pm 0.26 \times 10^{-10}$  g/m s Pa para BPM;  $3.38 \pm 0.11 \times 10^{-10}$  g/m s Pa para MPM; mientras que las películas de quitosano APM presentaron un valor de  $4.55 \pm 0.6 \times 10^{-11}$  g/m s Pa. En este sentido, es importante observar que la PVA de las películas de quitosano BPM fue 9 veces mayor que las de APM, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que cuanto mayor es el peso molecular del quitosano, menor es la permeabilidad de la película (Figura 2.19), probablemente debido al desarrollo de una estructura más compacta entre las cadenas del quitosano de mayor grado de polimerización. Leceta y col. (2013) encontraron una tendencia similar trabajando en películas formuladas con dos

quitosanos con grado de desacetilación de 75% y con peso molecular diferente, aunque los autores no los especificaron.

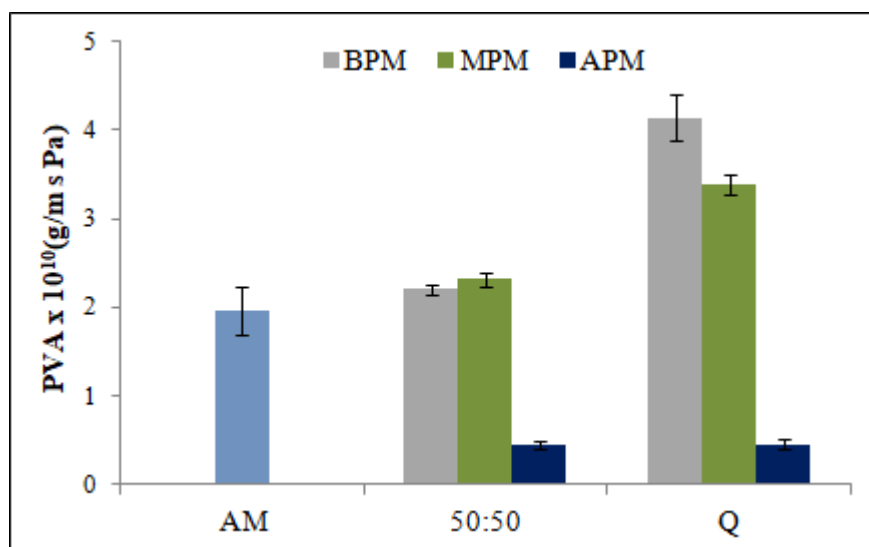


Fig. 2.19: Permeabilidad al vapor de agua de películas de un solo componente (almidón de maíz AM, y quitosano Q) y películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular

Motta de Moura y col. (2011) han subrayado que el peso molecular y el grado de desacetilación afectan la hidrofiliidad y cristalinidad del material y, en consecuencia, influyen en la permeabilidad al vapor de agua y en las propiedades mecánicas del film obtenido a partir de quitosano. Del mismo modo, se observó un menor grado de interacción entre glicerol y quitosano en el caso del quitosano BPM, lo que facilita la migración de las moléculas de vapor de agua a través de la película (Leceta y col., 2013).

Los valores de PVA de las películas compuestas de almidón/quitosano APM no difirieron estadísticamente ( $p > 0.05$ ) de los obtenidos para la película de quitosano correspondiente. Las películas compuestas de quitosano MPM y BPM exhibieron valores de PVA similares, que fueron intermedios entre los de las películas de un solo componente, lo que indica el efecto beneficioso de la adición de almidón de maíz en las propiedades de barrera de la película (Figura 2.19), llevando consecuentemente a una reducción en la velocidad de transmisión del vapor de agua. Una explicación similar fue propuesta por Chillo y col. (2008) en el caso de películas formuladas a base de quitosano y almidón de mandioca.

### 2.3.2.2 Solubilidad

Con respecto a la solubilidad en agua de las películas, el peso molecular del quitosano afectó drásticamente esta propiedad fisicoquímica, encontrándose que cuanto menor es el peso molecular del quitosano mayor es la solubilidad del material (Figura 2.20). Una tendencia similar también fue informada por Leceta y col. (2013). La solubilidad de las películas de quitosano depende también del grado de desacetilación, de la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena principal y de la naturaleza del ácido utilizado para la protonación en la etapa de disolución del polímero (Pillai y col., 2009).

Por otra parte, las películas de almidón de maíz mostraron un valor de solubilidad similar al del quitosano MPM. En el caso de películas compuestas, las formuladas con quitosano BPM presentaron valores de solubilidad intermedios entre los correspondientes a las películas de componentes individuales. Mientras tanto, para las películas compuestas formuladas con quitosano MPM se observó un efecto sinérgico entre ambos polisacáridos, registrándose un valor significativamente menor ( $p < 0.05$ ) (Figura 2.20).

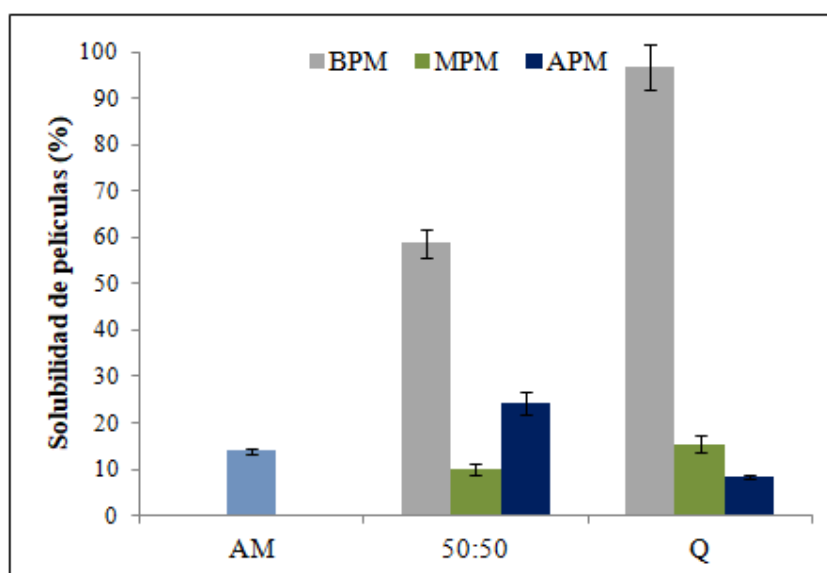


Fig. 2.20: Solubilidad de películas de un solo componente (almidón de maíz AM y quitosano Q) y de películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular

#### 2.3.3.4 Espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier

La técnica FTIR es útil para analizar los grupos funcionales de las películas poliméricas y determinar las posibles interacciones entre Q y AM en sistemas compuestos. La Figura 2.21 muestra los espectros FTIR de películas de quitosano con diferentes pesos moleculares; en general, las películas de quitosano de BPM mostraron una mejor definición de los picos de absorción que las correspondientes a MPM y APM. La ventana espectral situada en la región comprendida entre  $3600$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  experimentó un ensanchamiento con el aumento del peso molecular de quitosano, lo que indica una mayor intensidad de los enlaces de hidrógeno entre el polímero con el plastificante y las moléculas de agua asociadas a la estructura de la película. Esta banda ancha puede atribuirse al pico de absorción característico de los grupos amino en la región de  $3400$ - $3500\text{ cm}^{-1}$ , que está enmascarada por la banda de absorción amplia del grupo  $\text{-OH}$  (Sionkowska y col., 2004; Martínez-Camacho y col., 2010; López y col., 2014). Del mismo modo, se detectaron picos situados en la región de  $3000$ - $2800\text{ cm}^{-1}$ , lo que se puede atribuir a los modos de estiramiento simétrico y anti-simétrico de Q en el grupo funcional metil ( $\text{CH}_3$ ) y metileno ( $\text{CH}_2$ ) (López y col., 2014).

Dentro de la ventana espectral de  $2000$ - $800\text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.21B), las bandas de absorción típicas del polímero se sitúan en  $1656$  y  $1551\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a la amida I y II, respectivamente (Wu y col., 2005). Además, se observaron picos alrededor de  $901$  y  $1155\text{ cm}^{-1}$  y otro pico a  $1591\text{ cm}^{-1}$ , que exhibieron una mejor definición en películas BPM (Figura 2.21B). Estos picos de absorción fueron asignados por Cheng y col. (2003) a la estructura de los sacáridos y grupos amino, respectivamente.

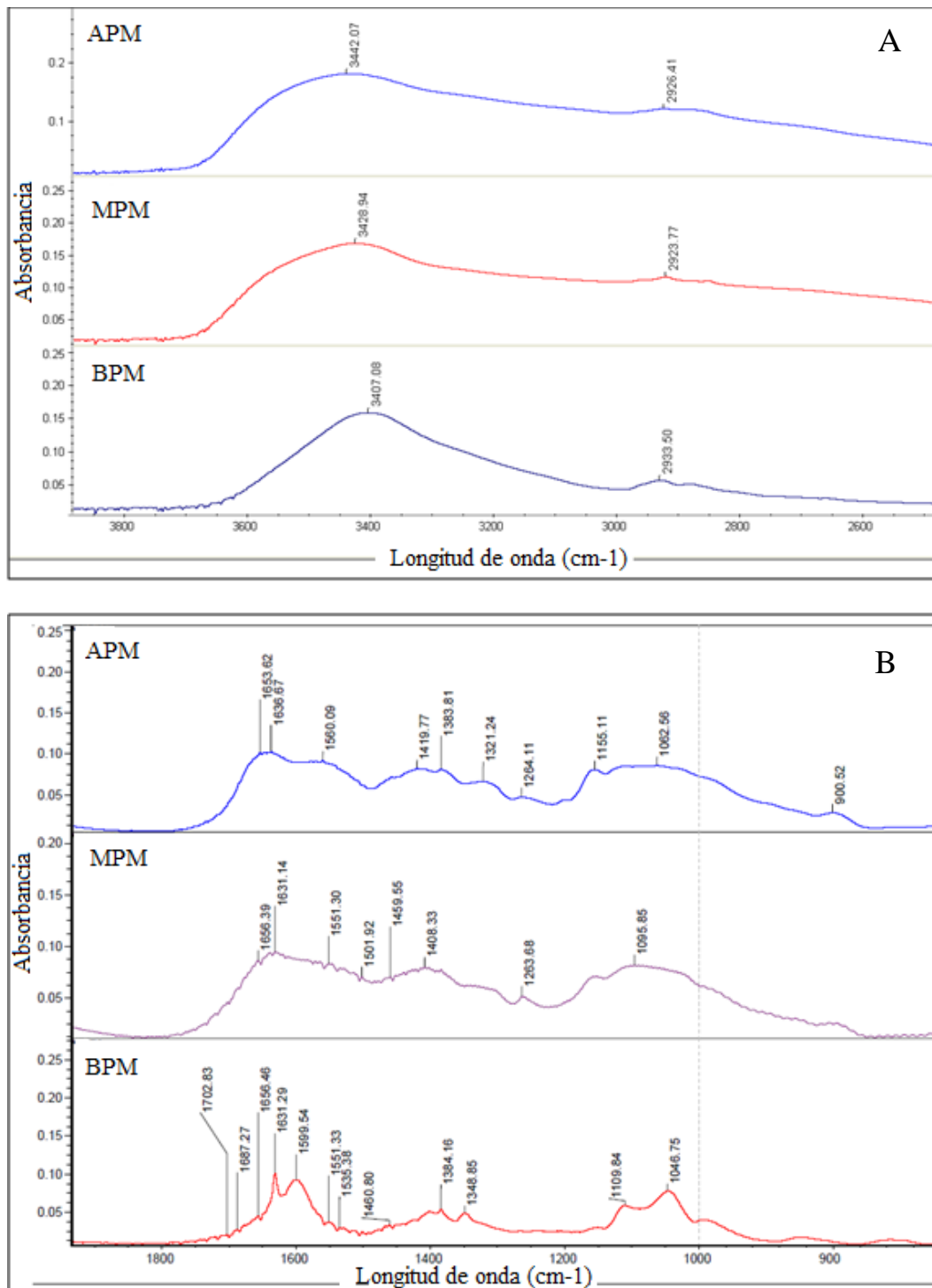


Figura 2.21: Espectros FTIR obtenidos para las películas de quitosano de distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: medio peso molecular y APM: alto peso molecular). Ventanas espectrales: A) 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$  y B) 2000-800  $\text{cm}^{-1}$ .



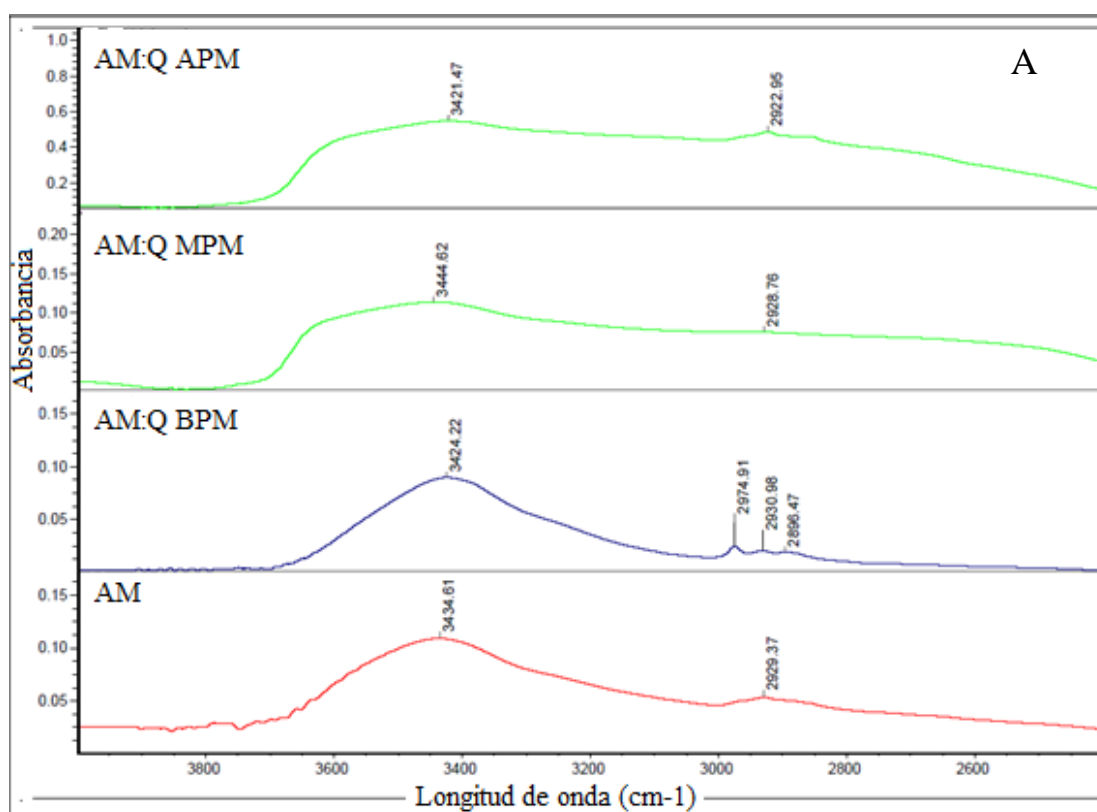
Con respecto a las películas de AM (Figura 2.22), se identificaron los picos situados a 920, 1074 y 1156  $\text{cm}^{-1}$ , los que corresponden al estiramiento del enlace CO, ocurriendo a 1074  $\text{cm}^{-1}$  (menos definido) el estiramiento característico del anillo de anhidroglucosa (Zhang & Han, 2006). El pico observado a 1413  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al modo de deformación simétrica del  $-\text{CH}_3$  (Salleh y col., 2009). Las bandas que aparecen a 1459 (menos definido) y 1661  $\text{cm}^{-1}$  se asignaron al plegamiento  $\delta$  del grupo OH del agua y al  $\text{CH}_3$ , respectivamente (Mano y col., 2003). Estos resultados son comparables con los reportados por otros autores (Zhang & Han, 2006, Fang y col., 2002; Kacuráková & Wilson, 2001; López y col., 2014). La banda extremadamente ancha que aparece con una intensidad máxima a 3434  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las interacciones de enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo. Tal como se describió anteriormente, esta banda corresponde al complejo de vibración de estiramiento asociado con grupos hidroxilo libres y evidenció la formación de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares en películas de almidón plastificadas (Wu, 2003; Fang y col., 2002).

Los espectros de FTIR de las películas compuestas exhibieron las señales típicas tanto de almidón como de quitosano (Fig. 2.22). Como en el caso de espectros de las películas de un solo componente, los picos de las películas de Q de BPM fueron más definidos que los de las de MPM y APM. El pico que aparece a 2929  $\text{cm}^{-1}$  es característico del estiramiento del enlace C-H y puede observarse en todos los espectros. El aumento de la amplitud de la señal de 3400  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2.22A) es una vez más indicativo del desarrollo de interacciones de enlaces puente de hidrógeno en películas compuestas, que es el mecanismo de interacción predominante entre los polímeros hidrofílicos.

Los espectros de las películas compuestas presentaron pequeñas modificaciones en la posición de algunas bandas en el rango de 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  que están relacionadas con grupos amino y carbonilo. La Figura 2.22B muestra que en las películas compuestas, la banda de absorción situada a 1661  $\text{cm}^{-1}$  en las películas a base de AM, atribuida a vibraciones de flexión de grupos OH, se superpone con la banda de amida I alrededor de 1656  $\text{cm}^{-1}$  de los films de Q que experimentan un cambio a menor longitud de onda en el caso de las mezclas, registrándose a 1652, 1650 y 1655  $\text{cm}^{-1}$  para BPM, MPM y APM, respectivamente. Los cambios observados, así como la disminución de la señal de absorción indican el desarrollo de interacciones entre los grupos funcionales AM y Q y

demuestran la compatibilidad de ambos polímeros. Resultados similares fueron informados por Martínez-Camacho y col. (2010), quienes señalaron que el desplazamiento hacia la derecha del pico de amida I sugiere que los grupos  $-NH_2$  están comprometidos en la formación de enlaces de hidrógeno.

Del mismo modo, en las películas a base de Q se observó la aparición de un hombro a  $1460-1457\text{ cm}^{-1}$  (Figura 2.21B y 2.22B), y se atribuyó al estiramiento del grupo  $CH_2$  (Wilhelm y col., 2003). Esta señal indica que el plastificante añadido se unió químicamente a las cadenas poliméricas, demostrando la plastificación interna de la matriz de Q.



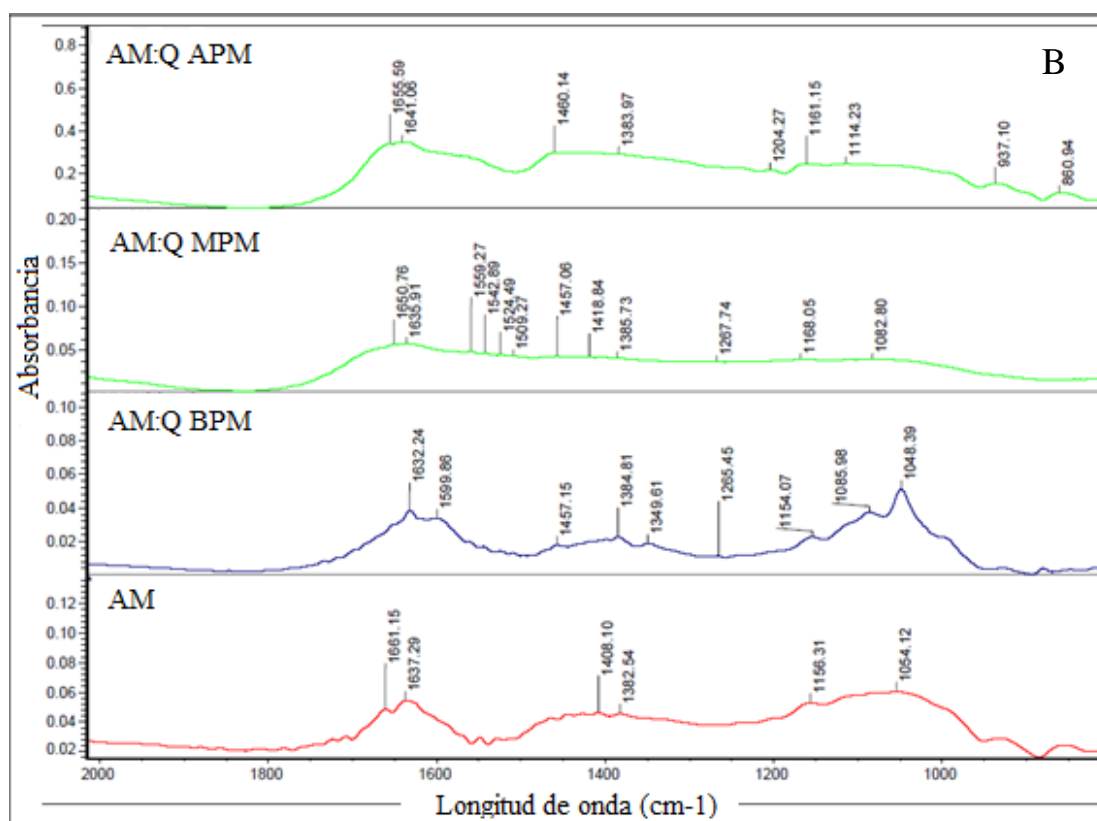


Figura 2.22: Espectros FTIR para películas compuestas de almidón de maíz (AM) y quitosano (Q) con distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: medio peso molecular y APM: alto peso molecular). Ventanas espectrales: A) 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$  y B) 2000-800  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.2.3 Análisis dinámico mecánico (DMA): barrido de frecuencias

En general, el rango viscoelástico lineal se encontró alrededor de 12  $\mu\text{m}$  para películas que contenían almidón y de 15  $\mu\text{m}$  para películas de Q, independientemente del peso molecular del quitosano. Así, los ensayos de barrido de frecuencia en función de la temperatura se realizaron a una amplitud constante de 5  $\mu\text{m}$ .

Las películas de quitosano exhibieron, dos relajaciones,  $\beta$  y  $\alpha$ , con el aumento de la temperatura, (Figura 2.23A). La localización de ambas transiciones dependió del peso molecular del quitosano utilizado. Por ejemplo, la relajación  $\beta$  se situó alrededor de -25.5, -14.5 y -19.6°C para el quitosano de peso molecular bajo, medio y alto respectivamente. Neto y col. (2005) y Mucha & Pawlak (2005) informaron que las películas de quitosano exhibieron un evento asociado con la relajación  $\beta$  alrededor de -20 a -10°C, característica

del movimiento local de los grupos laterales en el polisacárido. El segundo pico en las curvas  $\tan \delta$  de los espectros mecánicos dinámicos de las películas de Q correspondía a la relajación  $\alpha$ . La temperatura a la que tuvo lugar puede definirse como la temperatura de transición vítrea dinámica  $T_g$ , y en este caso se encontró a 32.2, 46.8 y 81.4°C para películas de quitosano BPM, MPM y APM, respectivamente (Figura 2.23A).

Los patrones dinámico-mecánicos de las películas de almidón de maíz plastificado muestran dos relajaciones, una localizada a -41.6 °C, asociada a la transición vítrea de la fase rica en plastificante, y otra a 57.8 °C, atribuida a la fase rica en almidón (Figura 2.23B). Varios autores destacaron que las mezclas de almidón y glicerol son sistemas parcialmente miscibles, dando origen a sistemas bifásicos (Da Roz y col., 2006; García y col., 2009; Mathew & Dufresne, 2002). Los resultados hallados en el presente trabajo están en concordancia con los informados por López y col. (2011) trabajando en películas de almidón de maíz nativo y acetilado. Una tendencia similar también fue reportada por otros autores para las películas formuladas con almidones nativos de diferentes fuentes, como el de maíz waxy o ceroso (García y col., 2009), de guisante (Ma y col., 2009) y de mandioca (Famá y col., 2006).

En el caso de las películas compuestas, el peso molecular de Q no afectó la localización de ambos picos observados (Figura 2.23B). Mientras que el primer pico se situó alrededor de los -25°C, más cerca de los valores correspondientes a la transición  $\beta$  en las películas Q, el segundo se ubicó alrededor de 60°C, más cerca de los valores asociados a la transición de la fase rica en almidón en películas AM.

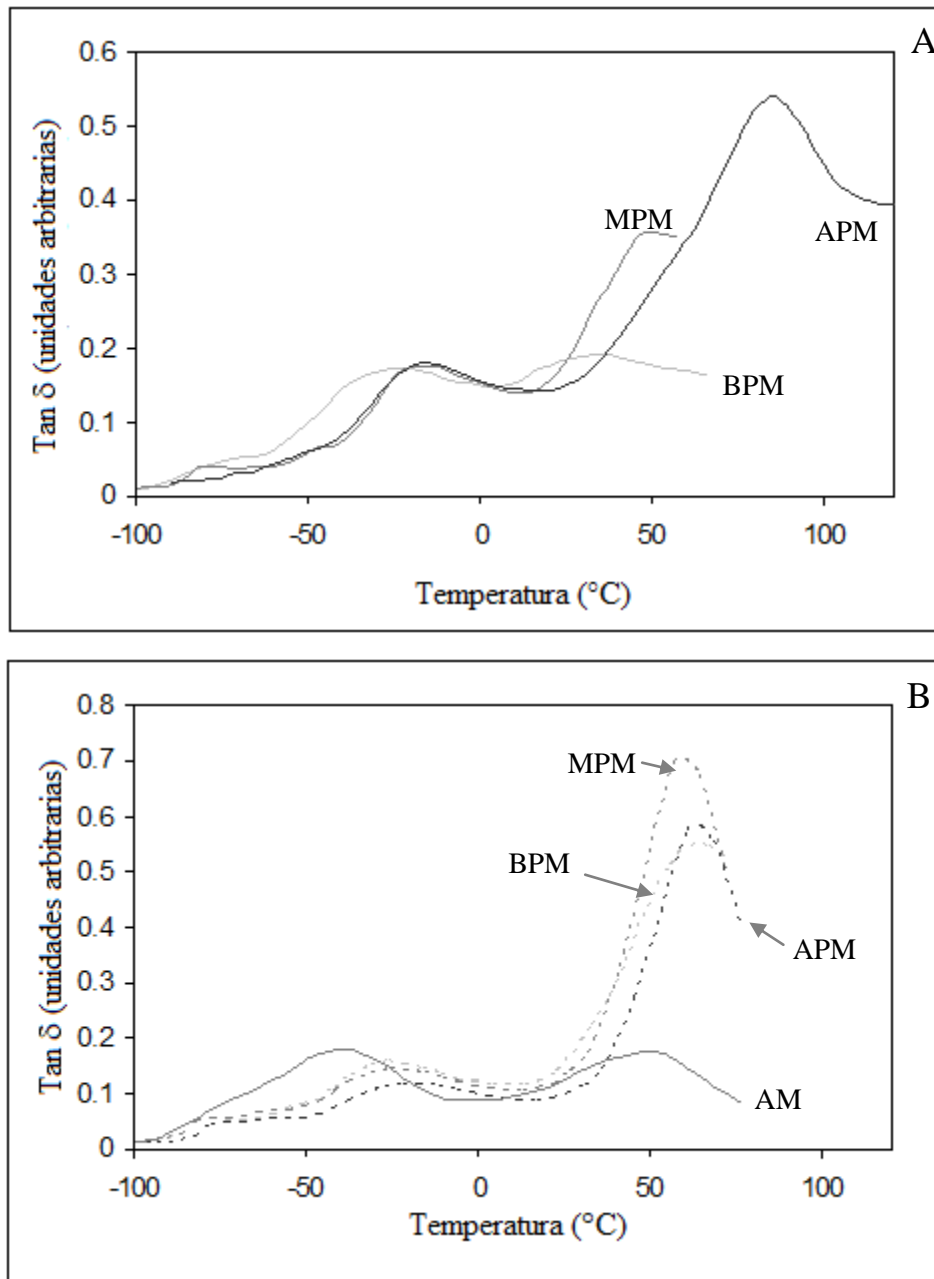


Fig. 2.23: Espectro dinámico-mecánico de películas de A: quitosano de distinto peso molecular y B: almidón maíz (AM) y películas compuestas por ambos biopolímeros en igual proporción (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular)

### 2.3.3.5 Propiedades mecánicas

### 2.2.3.5.1 Tracción

El estudio de las propiedades mecánicas de las películas permite estimar la resistencia y durabilidad de las mismas, cuando se vean sometidas a esfuerzos durante su manipulación y almacenamiento.

Estas propiedades mecánicas dependen de la interacción entre el polímero base formador de la película y pequeñas moléculas presentes en la formulación, como el agua, el plastificante y los agentes emulsionantes.

Un estudio exhaustivo de las propiedades mecánicas de las películas desarrolladas se realizó a través de diferentes pruebas complementarias. Con respecto a los ensayos de tracción, en general, las películas desarrolladas plastificadas exhiben el comportamiento tensión-deformación de materiales poliméricos dúctiles. En la Fig. 2.24 se muestran los perfiles mecánicos obtenidos en el texturómetro para las películas de almidón, de quitosano BPM y películas compuestas.

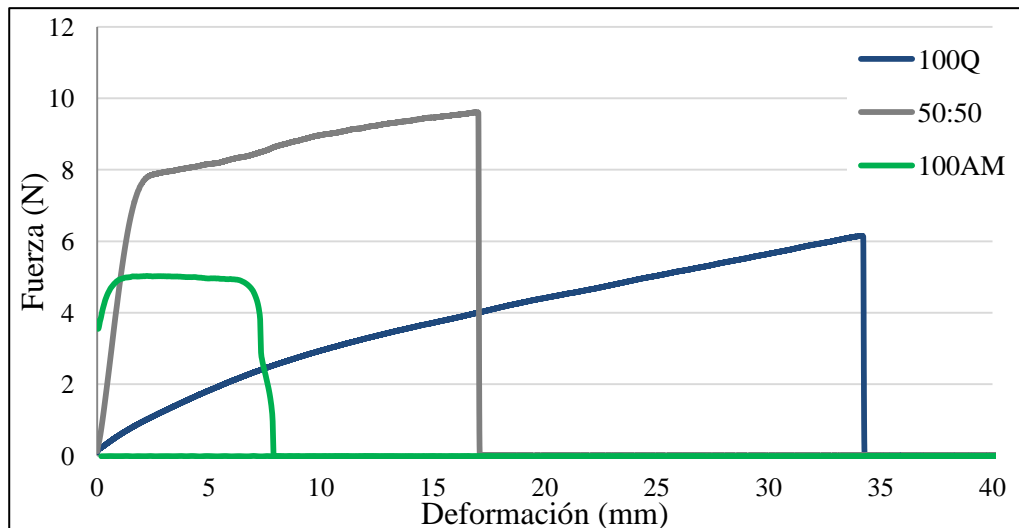


Fig. 2.24: Perfil mecánico para películas de almidón de maíz, de quitosano y películas compuestas

En todas las formulaciones de películas, se observó que el módulo elástico seguía la misma tendencia que el esfuerzo de tensión (TS). Los principales parámetros de tracción de las películas AM fueron:  $TS = 8.94 \pm 0.62$  MPa,  $E = 30.7 \pm 2.62$  MPa y  $EB = 27.11 \pm 2.04\%$ .

Estos valores se encuentran dentro del rango de lo reportado por otros autores para películas plastificadas a base de almidón (Mali y col., 2002; López y col., 2008 y 2011).

En las Figuras 2.25, 2.26 y 2.27, se encuentran graficados los parámetros mecánicos (Esfuerzo de tensión, % de Deformación y Módulo de elasticidad o de Young) obtenidos tanto para las películas de un solo componente (almidón de maíz y quitosano), como para las películas compuestas (50:50).

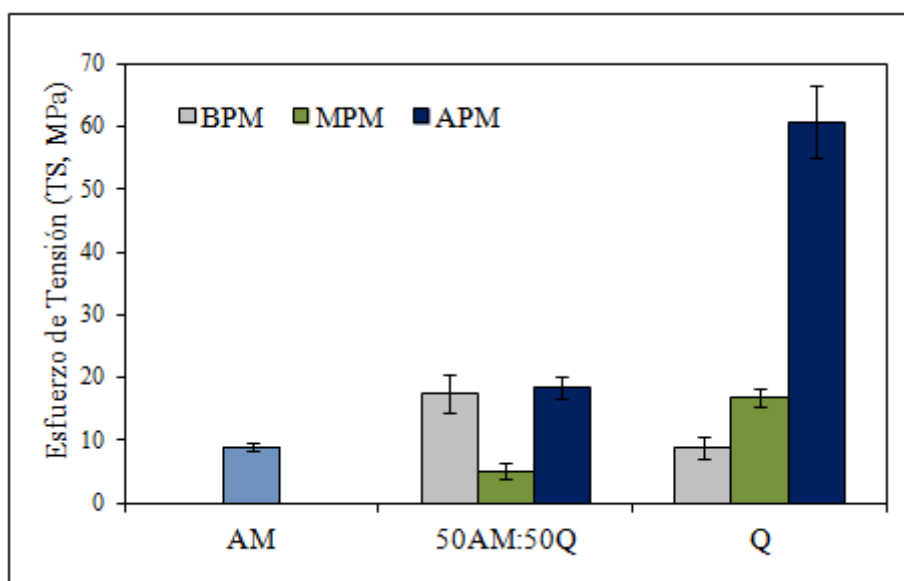


Fig. 2.25: Esfuerzo de tensión (MPa) para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular)

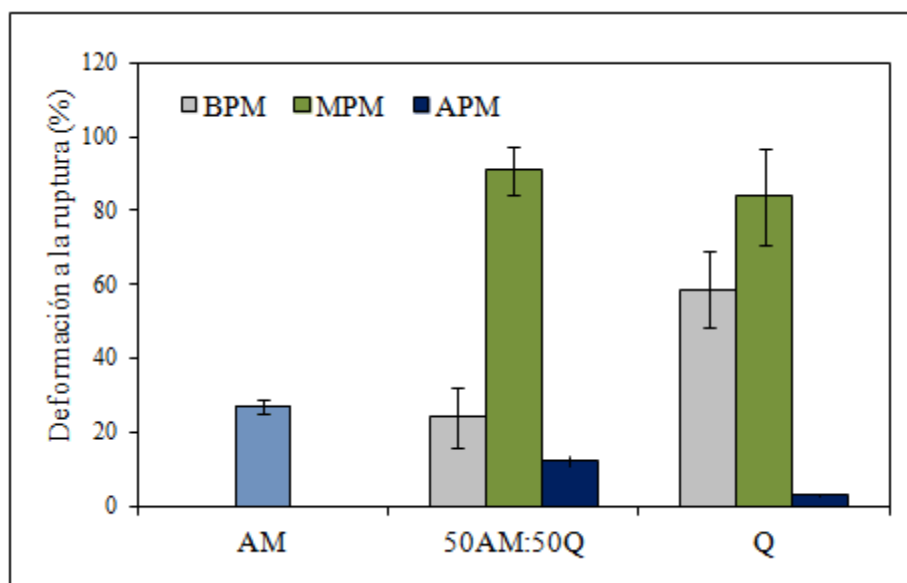


Fig. 2.26: Porcentaje de deformación para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular)

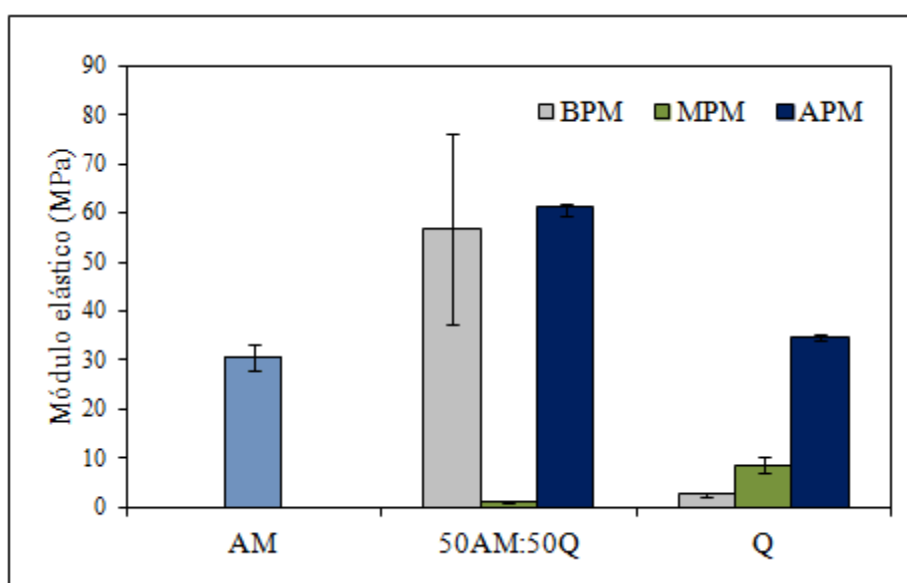


Fig. 2.27: Módulo de elasticidad (MPa) obtenido para películas de almidón de maíz (AM), quitosano (Q) de distinto peso molecular y películas compuestas (50:50) (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular)



El perfil mecánico de las películas de Q depende fuertemente de su peso molecular. Mientras que las películas formuladas con quitosano APM fueron frágiles y rígidas, debido a que mostraban altos valores de módulo de elasticidad y de resistencia a la tracción y bajos valores de elongación a la ruptura, las formuladas con MPM y BPM resultaron extremadamente deformables y flexibles, tal como puede verse en la Figura 2.25. Esto podría atribuirse a los efectos del peso molecular de quitosano sobre el tipo y número de interacciones polímero-polímero, polímero-plastificante y polímero-disolvente, que determinan la estructura y características de la matriz polimérica. El quitosano APM presenta cadenas de alto grado de polimerización, lo que favorece las interacciones polímero-polímero, dando lugar a matrices fuertes, típicas de las películas de alta resistencia. Contrariamente, para el quitosano BPM, las interacciones polímero-plastificante y polímero-disolvente se hicieron importantes y se favoreció el desarrollo de materiales de alta elasticidad. Martínez-Camacho y col. (2010), destacó también que la presencia del plastificante en las películas obtenidas con quitosano de peso molecular medio reduce el esfuerzo necesario para la deformación, así como la deformación de los films antes de la ruptura. Leceta y col. (2013) trabajando con películas a base de quitosano informó que los valores de TS y el módulo de elasticidad aumentaron mientras que el alargamiento a la ruptura disminuyó cuando el peso molecular de quitosano aumentó, debido a la formación de una red más compacta.

Del mismo modo, existe una amplia gama de datos reportados en la literatura sobre las propiedades mecánicas de las películas de Q; las diferencias pueden atribuirse a la composición del Q y a los proveedores, así como a las técnicas de preparación de la película (Park y col., 2002; Xu y col., 2005; Rivero y col., 2012; Leceta y col., 2013).

El comportamiento mecánico a la tracción de las películas compuestas se vio fuertemente afectado por el peso molecular de Q. El valor de TS de las películas compuestas de APM fue intermedio entre los de las películas de un solo componente, mientras que las de MPM presentaron un efecto antagónico y las de BPM manifestaron un efecto sinérgico. Xu y col. (2005) enfatizó que las moléculas de amilosa lineal pueden alinearse cerca o asociarse con moléculas de quitosano lineales similares para formar los enlaces de hidrógeno intermoleculares; la extensión de esta interacción es controlada por el peso molecular del quitosano, lo que ayuda a explicar el efecto sinérgico o antagónico descripto. Del mismo

modo, los valores de deformación a la ruptura de las películas compuestas de BPM no difirieron significativamente ( $p > 0.05$ ) de las de AM, aunque fueron menores ( $p < 0.05$ ) que el valor de la correspondiente película de Q (Figura 2.26). En el caso de la mezcla MPM, se observó el comportamiento opuesto, mientras que para las mezclas APM los valores obtenidos fueron intermedios entre las películas de componentes individuales.

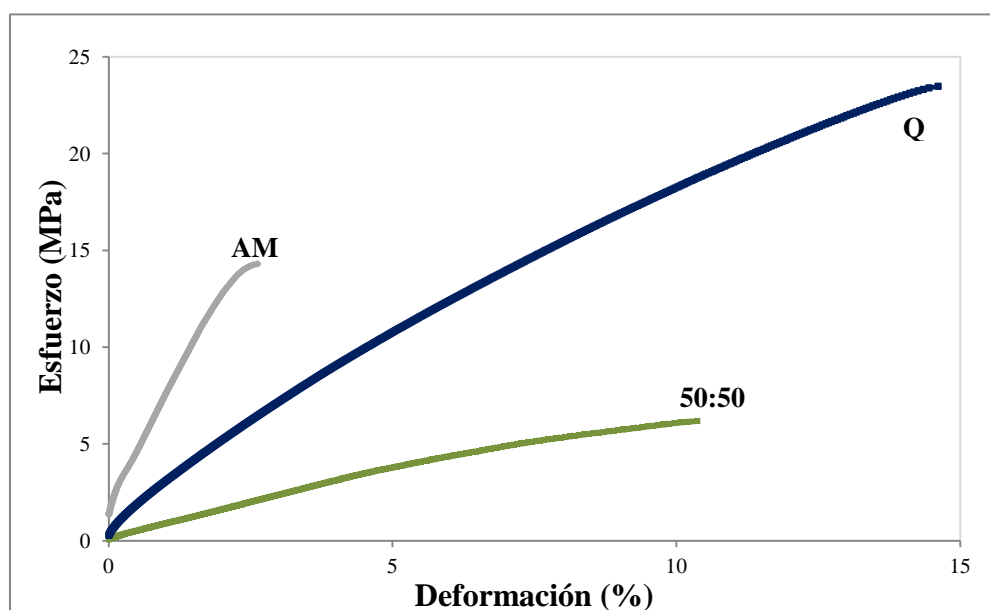


Fig. 2.28: Curvas de comportamiento de esfuerzo en función de la deformación para películas de almidón de maíz, de quitosano (BPM) y películas compuestas

Además, las propiedades mecánicas se evaluaron mediante ensayos de tensión uniaxial a través de DMA (Fig. 2.28). Las curvas tensión-deformación mostraron las respuestas mecánicas de las películas basadas en Q de BPM. En todos los casos, el modelo propuesto para estimar el módulo elástico ajustó satisfactoriamente los datos experimentales ( $r^2 > 0.93$ ); los valores obtenidos para los parámetros dinámicos mecánicos se presentan en la Tabla 2.7. En pruebas uniaxiales, las películas AM se caracterizan por valores elevados de  $E_c$  (módulo elástico dinámico) y bajos de tensión y estrés, estando los valores obtenidos dentro del rango de los reportados para almidón de yuca reforzado (Versino & García, 2014) y películas de almidón de maíz plastificado (Muscat y col., 2012). En cuanto a las películas basadas en Q, el módulo elástico dinámico fue significativamente mayor ( $p <$

0.05) para las películas de APM lo cual está relacionado con el comportamiento mecánico de tracción frágil y rígido descrito anteriormente. Los valores de  $E_c$  inferiores reportados para MPM y BPM, así como la deformación más alta registrada, son de nuevo indicativos de materiales deformables y flexibles (Tabla 2.7). Estos resultados refuerzan la idea de que el desarrollo de la estructura de la matriz polimérica y las características de la película dependen del peso molecular del quitosano. El comportamiento dinámico mecánico de las películas compuestas fue afectado por el peso molecular de Q, mientras que las que contenían MPM mostraron un comportamiento similar al de las películas de AM, exhibieron un efecto antagónico BPM y APM, lo que es contrario a lo observado en ensayos de tracción. Del mismo modo, Salaberria y col. (2015) informaron un módulo elástico dinámico similar para películas de almidón termoplástico que contenían nanocristales de quitina y nanofibras.

Tabla 2.7: Parámetros dinámicos mecánicos para películas plastificadas formuladas con almidón de maíz, quitosano de distinto peso molecular y la mezcla de ambos en iguales proporciones.

Película	Peso Molecular Q (PM)	Parámetros dinámicos mecánicos de ensayo de tensión uniaxial				
		Módulo elástico dinámico $E_c$ (MPa)	Parámetro de ajuste K de $E_c$ . 2.13	$r^2$	Deformación máxima (%)	Esfuerzo máximo (MPa)
AM	-	1235 ± 362 <sup>a</sup>	41.6 ± 27.5 <sup>a</sup>	0.930	2.05 ± 0.79 <sup>c</sup>	11.91 ± 3.38 <sup>c</sup>
50:50	BPM	105 ± 33 <sup>d</sup>	5.3 ± 2.1 <sup>c,b</sup>	0.984	9.04 ± 1.42 <sup>b</sup>	5.77 ± 0.62 <sup>d</sup>
	MPM	1385 ± 240 <sup>a</sup>	24.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	0.982	4.67 ± 0.58 <sup>d</sup>	20.9 ± 3.52 <sup>b</sup>
Q	APM	133 ± 19 <sup>d</sup>	6.4 ± 1.1 <sup>c,b</sup>	0.999	9.09 ± 0.42 <sup>b</sup>	22.30 ± 2.21 <sup>b</sup>
	BPM	338 ± 116 <sup>c</sup>	5.2 ± 2.7 <sup>c,b</sup>	0.992	12.82 ± 2.5 <sup>a</sup>	22.88 ± 0.81 <sup>b</sup>
Q	MPM	400 ± 22 <sup>c</sup>	4.8 ± 0.8 <sup>c,b</sup>	0.999	7.97 ± 0.21 <sup>c</sup>	21.18 ± 0.73 <sup>b</sup>
	APM	656 ± 162 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.999	7.69 ± 0.24 <sup>c</sup>	48.61 ± 2.62 <sup>a</sup>

AM: almidón de maíz; Q: quitosano; BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.3.6 Color

Todas las dispersiones filmogénicas fueron capaces de formar películas homogéneas que se separaron fácilmente de las placas de acrílico. Cabe señalar que las películas preparadas con quitosano BPM y MPM presentaron un color ligeramente amarillento (Figura 2.29).

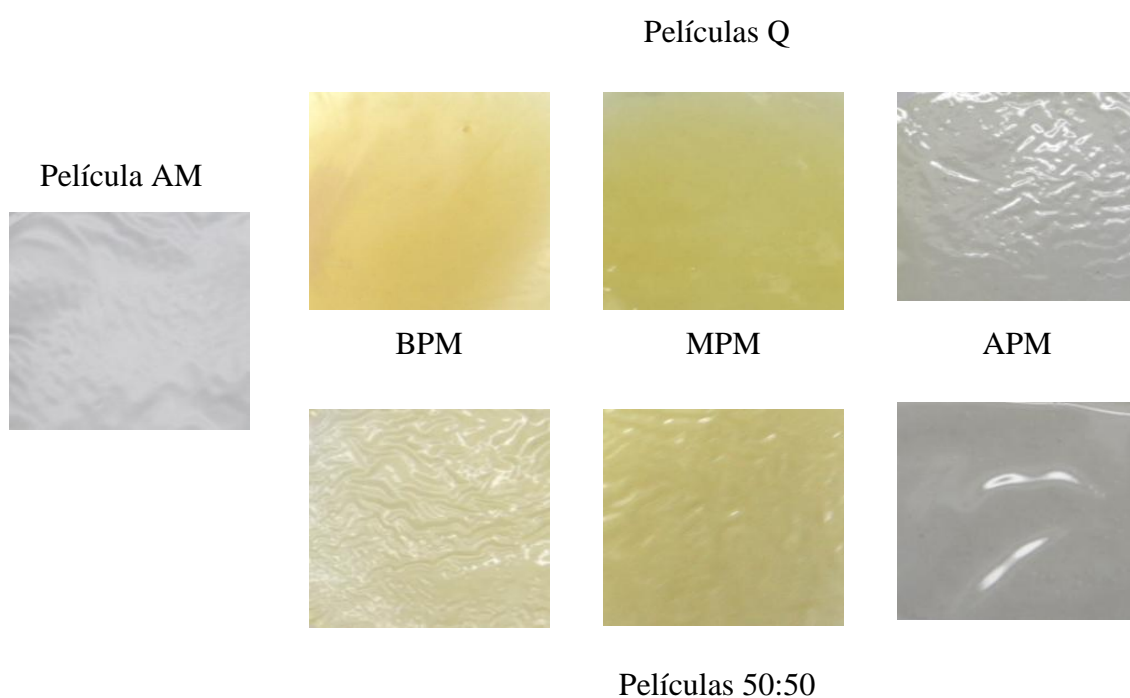


Fig. 2.29: Apariencia de películas de almidón de maíz (AM), de quitosano (Q) y de películas compuestas 50:50.

La Figura 2.30 muestra los resultados de color para las películas AM y Q, así como las compuestas. La luminosidad de las películas de AM exhibió valores más altos que las de Q, mientras que las películas compuestas presentaron valores intermedios, independientemente del PM del quitosano utilizado. Aunque, las diferencias de luminosidad fueron marcadas para las películas formuladas con BPM (Figura 2.30A).

La luminosidad de las películas de quitosano dependió del peso molecular del biopolímero, aunque se encontraron valores más altos para BPM seguido por MPM, no se pudo establecer una tendencia clara. Estas diferencias observadas podrían atribuirse a la fuente de quitosano, que en el caso de BPM y MPM no fueron reportadas. Varios autores han destacado el efecto de la fuente de quitosano sobre sus propiedades y específicamente sus atributos de color (Hwang y col., 2003).

El parámetro de cromaticidad  $b^*$  exhibió los cambios más importantes (Figura 2.30B). En todos los casos, los valores de  $b^*$  de las películas AM fueron inferiores a los de Q, presentando las mezclas valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) que los de las películas de un solo componente. En general, las películas basadas en polisacáridos son típicamente incoloras, aunque las de Q son ligeramente amarillentas, lo que se ha atribuido a reacciones de Maillard entre grupos amino e hidroxilo de moléculas de quitosano (López y col., 2014). Del mismo modo, los valores de  $b^*$  de las películas a base de Q dependen del peso molecular del polímero, mostrando que las películas de BPM tienen valores más bajos que los de los MPM, aunque tampoco se pudo establecer una clara tendencia, probablemente debido a las diferencias en la fuente de quitosano.

Las diferencias de color de las películas siguen una tendencia similar a la del parámetro de cromaticidad  $b^*$ . En general, las películas de AM presentaron valores de  $\Delta E$  inferiores a los de las películas compuestas, siendo ambos menores que los de las películas a base de Q, independientemente del PM (Figura 2.30C). Sin embargo, al analizar los valores obtenidos para las películas Q se pudo encontrar una tendencia clara con el peso molecular, cuanto menor era el PM, mayor era el  $\Delta E$ . En este caso se potenció el efecto tanto de la luminosidad como del parámetro  $b^*$ . Las películas a base de quitosano APM condujeron a diferencias de color  $\Delta E$  más bajas, lo cual es de primordial importancia puesto que las propiedades visuales de las películas determinan la aceptabilidad global de los consumidores en relación con los productos envasados.

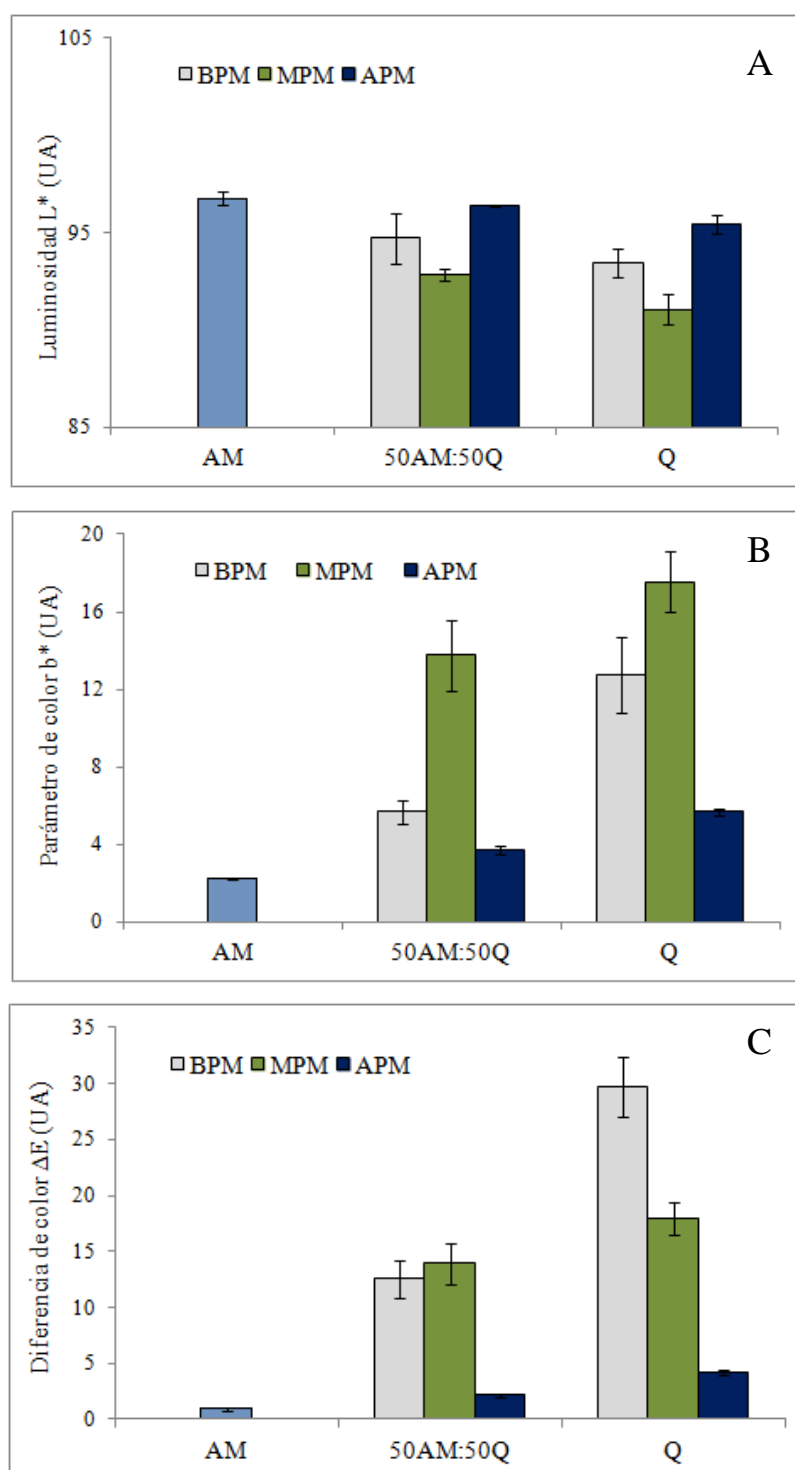


Fig. 2.30: Parámetros de color en películas de almidón de maíz (AM), de quitosano (Q) y de películas compuestas con quitosano de distinto peso molecular (BPM: bajo peso molecular; MPM: peso molecular medio; APM: alto peso molecular). A: Luminosidad; B: Parámetro de color b\*; y C: Diferencias de color  $\Delta E$  en unidades arbitrarias

#### **2.4 Conclusión**

Los ensayos realizados permitieron determinar las propiedades de las películas compuestas y de un solo componente (almidón y quitosano). El peso molecular del quitosano utilizado afectó el comportamiento reológico de las soluciones filmogénicas y las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. En relación a las propiedades fisicoquímicas se observó que a menor peso molecular del quitosano empleado en la formulación mayor es la solubilidad y las diferencias de color de las películas obtenidas.

Se observó que en general, para las películas compuestas, las propiedades eran intermedias a las de los sistemas de un solo componente; es decir, que al mezclar los dos polímeros, se manifiestan las propiedades de cada uno de ellos. Esto se puede explicar a través de los espectros FTIR de los materiales, en donde encontró que el almidón y el quitosano son polímeros compatibles que interactúan mediante la formación de enlaces intermoleculares del tipo puente de hidrógeno. Estos enlaces son los responsables de las propiedades resultantes en las películas compuestas. Por lo tanto, el desarrollo de películas compuestas constituiría una ventaja respecto a los sistemas de un solo componente.

## 2.5 Referencias bibliográficas

- ASTM F88-00 (2000). Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials, ASTM International, West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials.
- Baldwin, E.A. & Wood, B. (2006). Use of edible coating to preserve pecans at room temperature. *Hort Science*, 41(1), 188-192.
- Casettari, L., Cespi, M., Palmieri, G.F. & Bonacucina, G. (2013). Characterization of the interaction between chitosan and inorganic sodium phosphates by means of rheological and optical microscopy studies. *Carbohydrate Polymers*, 91, 597-602.
- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N. & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from Chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24, 2871-2880.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. & Del Nobile, M.A. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88, 159–168.
- Da Roz, A.L., Carvalho, A.J.F., Gandini, A. & Curvelo, A.A.S. (2006). The effect of plasticizers on thermoplastic starch compositions obtained by melt processing. *Carbohydrate Polymers*, 63, 417.
- Famá, L., Flores, S.K., Gerschenson, L. & Goyanes, S. (2006). Physical characterization of cassava starch biolms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 66, 8–15.
- Fang, J.M., Fowler, P.A., Tomkinson, J. & Hill, C.A. (2002). The preparation and characterization of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 47, 245-252.
- García, N.L., Famá, L., Dufresne, A., Aranguren, M. & Goyanes, S. (2009). A comparison between the physico-chemical properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, 42, 976–982.
- Guilbert, S. & Gontard, N. (2005). Agro-polymers for edible and biodegradable films: Review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. In: *Innovation in Food packaging*, ed. J.H. Han, 263–276. London, U.K.: Academic Press.



- Han, J.H. & Floros, J.D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13, 287-298.
- Han, J.H. (2005). Edible films and coatings: A review. In: *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*, ed. J.H. Han, 213–255. Londres, Reino Unido: Academic Press.
- Hwang, K.T., Kim, J.T., Jung, S.T., Cho, G.S. & Park, H.J. (2003), Properties of chitosan based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights. *Journal of Applied Polymer Science*, 89 (13), 3476-3484.
- Kacuráková, M. & Wilson, R.H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44, 291–303.
- Lacroix, M. & Cooksey, K. (2005). Edible films and coatings from animal origin proteins. In: *Innovations in Food Packaging*, ed. J.H. Han, 301–307. London, U.K.: Academic Press.
- Leceta, I., Guerrero, P. & De la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93, 339 – 346.
- López, O.V., García, M.A. & Zaritzky, N.E. (2008). Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 573–581.
- López, O.V., Lecot, C.J., Zaritzky, N.E. & García, M.A. (2011). Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105, 254-263.
- López, O.V., García, M.A., Villar, M.A., Gentili, A., Rodriguez, M.S. & Albertengo, L. (2014). Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 106-115.
- Ma, X., Chang, P., Yu, J. & Stumborg, M. (2009). Properties of biodegradable citric acid-modified granular starch/thermoplastic pea starch composites. *Carbohydrate Polymers*, 75, 1-8.
- Mancini, F., Moresi, M. & Rancini, R. (1999). Mechanical Properties of Alginate Gels: Empirical Characterisation. *Journal of Food Engineering*, 39, 369.
- Mandal, A. & Nandi, A.K. (2011). Miscibility of Polythiophene-graft-poly(methyl methacrylate) brushes with Poly(vinylidene fluoride): Morphology, Optical and Conductivity Properties. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212, 1636-1647.

- Mano, J.F., Koniarova, D. & Reis, R.L. (2003). Thermal Properties of Thermoplastic Starch/Synthetic Polymer Blends with Potential Biomedical Applicability. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14, 127-135.
- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerro-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M.M., Yépiz-Gómez, M.S. & Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 305-315.
- Mathew, A.P. & Dufresne, A. (2002). Morphological investigation of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers. *Biomacromolecules*, 3, 609–617.
- Motta de Moura, C., Motta de Moura, J., Madeira Soares, N. & de Almeida Pinto, L.A. (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: Used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing*, 50, 351–355.
- Mucha, M. & Pawlak, A. (2005). Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*, 427(1–2), 69–76.
- Muscat, D., Adhikari, R., McKnight, S., Guo, Q. & Adhikari, B. (2013). The physicochemical characteristics and hydrophobicity of high amylose starch–glycerol films in the presence of three natural waxes. *Journal of Food Engineering*, 119, 205-219.
- Neto, C.G.T., Giacometti, J.A., Job, A.E., Ferreira, F.C., Fonseca, J.L.C. & Pereira, M.R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, 62, 97-103.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. & Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641–678.
- Ramesh, H. & Tharanathan, R.N. (2003). Carbohydrates the renewable raw materials of high biotechnological value. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 149-173.
- Remya, S., Mohan, C.O., Venkateshwarlu, G. Sivaraman, G.K. & Ravishankar, C.N. (2017). Combined effect of O<sub>2</sub> scavenger and antimicrobial film on shelf life of fresh cobia (*Rachycentron canadum*) fish steaks stored at 2°C. *Food Control*, 71, 71-78.
- Salleh, E., Muhamad, I. & Khairuddin, N. (2009). Structural characterization and physical properties of antimicrobial (AM) starch-based films. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 31, 428-436.

- Sionkowska, A., Wisniewski, M., Skopinska, J., Kennedy, C.J. & Wess, T.J. (2004). Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*, 5, 795-801.
- Suman, S.P., Mancini, R.A., Joseph, P., Ramanathan, R., Konda, M.K.R, Dady, G. & Yin, S. (2010). Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef. *Meat Science*, 86, 994-998.
- Tapia, M.S., Rojas-Graü, M.A., Carmona, A., Rodríguez, F.J., Soliva-Fortuny, R. & Martín-Belloso, O. (2008). Use of alginate and gellan based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*, 22, 1493-1503.
- Vartiainen, J., Vähä-Nissi, M. & Harlin, A. (2014). Biopolymer Films and Coatings in Packaging Applications - A Review of Recent Developments. *Materials Sciences and Applications*, 5, 708-718.
- Wilhelm, H., Sierakowski, M., Souza, G. & Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52, 101-110.
- Wu, C. (2003). Physical properties and biodegradability of maleated – polycaprolactone /starch composite. *Polymer Degradation and Stability*, 80, 127–134.
- Wu, Y., Zheng, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J. & Fu, S. (2005). Synthesis and characterization of a novel amphiphilic chitosan–polylactide graft copolymer. *Carbohydrate Polymers*, 59, 165–171.
- Zhang, Y. & Han, J. (2006). Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71, 109-111.

# CAPÍTULO 3

---

PELÍCULAS COMPUESTAS FORMULADAS CON DISTINTAS  
PROPORCIONES DE QUITOSANO Y ALMIDÓN

## **Capítulo 3: Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón**

### **3.1 Introducción**

La función principal de un empaque de alimentos es proteger a los productos que contiene, y esa protección debe estar en función de las características del producto envasado. La mayoría de los alimentos requieren protección contra la contaminación microbiana y el daño mecánico provocado por el manipuleo, caídas y golpes. En el caso del envasado de productos frescos es importante además, impedir su deshidratación por lo que es deseable que el material de empaque posea baja permeabilidad al vapor de agua. Otros alimentos contienen compuestos susceptibles al oxígeno, a la luz y a las radiaciones UV, por lo que en estos casos se requiere un envase que le confiera al producto protección contra estos factores.

Las propiedades de barrera al vapor de agua de los envases de productos alimenticios tienen gran importancia ya que además de prevenir la deshidratación, evitan el deterioro físico y químico relacionado con su contenido de humedad de equilibrio.

Por otra parte, los materiales de embalaje disponibles en forma de películas plásticas deben tener flexibilidad, presentar buenas propiedades mecánicas y de barrera, siendo deseable que tengan bajo impacto ambiental y en este sentido se valoran positivamente los materiales biodegradables o los que pueden ser fácilmente reciclados. Asimismo, con el fin de obtener envases flexibles tipo bolsas, los cuales son ampliamente utilizados en el mercado, las películas deberían ser capaces de sellarse con calor, resistir la tensión de transporte y tener bajo costo (Reesha y col., 2015). La calidad del sellado con calor o termosellado es crítica para mantener la integridad del envase, impedir la entrada de microorganismos y conservar sus propiedades de barrera (López y col., 2011).

Existen numerosas formas y tipos de empaque para alimentos. Entre ellos, se encuentran las películas biodegradables, que representan una alternativa sustentable a los empaques de plásticos provenientes de hidrocarburos (Cutter, 2006). Como se mencionó previamente, las películas biodegradables pueden obtenerse a partir polímeros de origen natural (proteínas, lípidos, ceras, polisacáridos) o de origen sintético como el ácido poliláctico o polihidroxialcanoatos, entre otros (Tharanathan, 2003).

Entre los polisacáridos naturales que presentan capacidad para formar películas, se destacan el almidón y el quitosano. Como ya se mencionó, el almidón es uno de los

componentes más abundantes del planeta, tiene bajo costo, y es biodegradable. Se puede obtener almidón de varias fuentes vegetales, los que difieren en la proporción de amilosa y amilopectina. Las propiedades mecánicas y de barrera, así como las condiciones de procesamiento de las películas a base de almidón, dependerán de la relación entre el contenido de amilosa y amilopectina. En general, la capacidad filmogénica del almidón ha sido asociada al contenido de amilosa (Forssell y col., 2002; Raquez y col., 2008; Rindlava y col., 1997). En relación a las diferentes fuentes botánicas, el almidón de maíz, con un 25% de amilosa, es una de las principales fuentes de almidón comercialmente disponible.

Por otra parte, el quitosano es un polisacárido derivado de la quitina, que tiene interés para la formulación de películas debido a su buena capacidad de formar films y a sus buenas propiedades mecánicas. Asimismo, es un polímero abundante, no tóxico, biodegradable y que posee actividad antimicrobiana (Roller y col., 2002; Georgantelis y col., 2007; Matet y col., 2014; Hosseinnejad & Jafari, 2016; Verlee y col., 2017).

Diversos autores estudiaron la compatibilidad de las mezclas de estos dos biopolímeros: quitosano y almidón (Xu y col., 2005; Bourtoom & Chinnan, 2008; Li y col., 2013; Silva-Weiss y col., 2013; Dang & Yoksan, 2015; Santacruz y col., 2015; Ren y col., 2017), y las propiedades de las películas obtenidas. Por su parte, Ren y col. (2017) confirmaron la formación de puentes de hidrógeno entre ambos polímeros y explicaron algunas propiedades de las películas compuestas. Sin embargo, son escasas las investigaciones relacionadas a los estudios exhaustivos de películas compuestas con diferente proporción de ambos biopolímeros.

En este Capítulo se estudiarán las películas compuestas de almidón con diferente proporción de quitosano, analizando las propiedades que resulten específicas para su aplicación como envase para alimentos. Asimismo, se realizará una proyección de los costos generados de la implementación de este tipo de envases biodegradables.

### **3.2 Materiales y Métodos**

Para los ensayos realizados en este capítulo se preparó una suspensión de almidón de maíz (A) al 4% (p/p) como se describió en el Capítulo 2. Además, se utilizó quitosano (Q) en polvo de peso molecular medio (MPM), provisto por Parafarm (Buenos Aires, Argentina). A partir de éste se prepararon soluciones al 2.5% (p/p) por disolución en ácido acético al

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

---

1.25% (p/p). Asimismo se trabajó con la solución de quitosano de bajo peso molecular (BPM) provista por Raisan® (Raisan, Argentina), como se detalló en el Capítulo 2; la misma se utilizó directamente, tal cual se adquirió del proveedor (solución al 2.5% p/p).

Por razones de elevado costo y escasa disponibilidad se descartó el uso de quitosano de alto peso molecular (APM).

Se formularon suspensiones filmogénicas (SFF) con distintas proporciones de almidón de maíz (AM) y quitosano (Q) las cuales se obtuvieron por la metodología descrita en el capítulo anterior (sección 2.2.1). Las SFF de los componentes puros y las suspensiones compuestas se identificaron como se indica en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Nomenclatura de las SFF y de las películas obtenidas.

Proporción de AM:Q	Nomenclatura
100% AM y 0% Q	100A
75% AM y 25% Q	75:25
50% AM y 50% Q	50:50
25% AM y 75% Q	25:75
100% Q y 0% AM	100Q

En todas las formulaciones se agregó glicerol como plastificante, en una concentración correspondiente al 25% p/p de sólidos; como se describió en el Capítulo 2. La homogeneización de las suspensiones filmogénicas se realizó del mismo modo.

#### 3.2.1 Caracterización de las SFF

Se realizó la caracterización reológica de las suspensiones formadoras de film (SFF) mediante ensayos rotacionales y dinámicos, tal como se describió en el capítulo anterior, sección 2.2.2.

### **3.2.2 Obtención de las películas**

Las SFF se trataron con una bomba de vacío durante 15 minutos para asegurar la eliminación de las burbujas de aire y las películas se obtuvieron por moldeo y deshidratación como se describió en el capítulo anterior, sección 2.2.3.

### **3.2.3 Propiedades de las películas**

Para la caracterización de las películas compuestas formuladas se determinaron las siguientes propiedades: humedad, espesor, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, análisis dinámico mecánico y propiedades mecánicas a la tracción. Para ello, se siguió la metodología que se describió en el capítulo anterior. La caracterización se complementó con el estudio de las propiedades que resultan relevantes considerando su aplicación para el envasado de alimentos y que se describen a continuación.

#### **3.2.3.1 Color superficial**

Como visualmente se evidenciaron diferencias entre las caras de las películas expuestas al aire durante el secado y las caras en contacto con la placa, en este capítulo se estudió este efecto en los parámetros de color. Así se determinó el desarrollo de color superficial de ambas caras de las muestras con la metodología que se describió en el capítulo anterior.

#### **3.2.3.2 Propiedades mecánicas a la punción**

Con el fin de evaluar propiedades relevantes para la aplicación de las películas en envases, también se realizaron ensayos de punción en el texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra) utilizando una sonda cilíndrica de 2 mm de diámetro (P/2). Se registraron las curvas de fuerza en función de la deformación (Fig. 3.1) y se determinó la fuerza máxima (N) y la deformación (mm) de cada película acondicionada, así como el área bajo la curva (N mm) que indica la tenacidad del material. Este último parámetro es indicativo de la cantidad de energía que una película absorbe antes de la perforación.



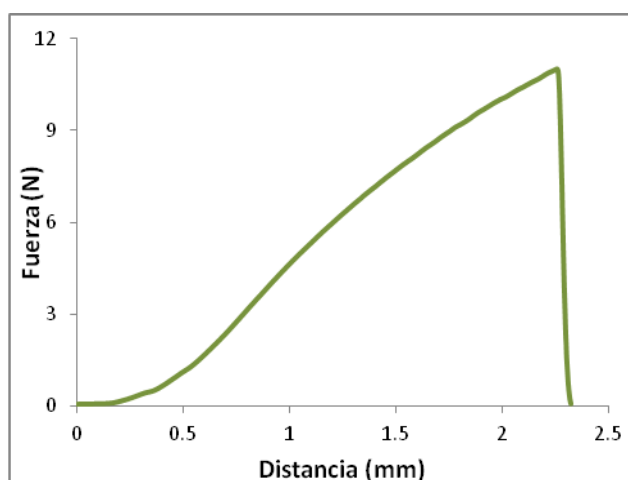


Figura 3.1: Perfil típico obtenido durante el ensayo de punción.

### 3.2.3.3 Capacidad de barrera al UV

Para el envasado de productos susceptibles a la oxidación, resulta relevante el análisis de la capacidad de barrera al UV del material. A tal fin se realizaron los espectros de absorbancia entre 200 y 800 nm, utilizando un espectrofotómetro U-1900 (HITACHI, Japón). Las películas se cortaron en rectángulos ( $3 \times 1 \text{ cm}^2$ ) y se colocaron en el interior de una celda de cuarzo. La capacidad de barrera al UV de las películas se estimó como el área bajo curva entre 200 y 400 nm, y se expresó en AU x nm. Para cada formulación se analizaron al menos 3 muestras.

### 3.2.3.4 Transparencia y opacidad

Otras propiedades ópticas de interés para esta aplicación son la determinación de la transparencia y la opacidad del material que son valoradas por el consumidor. La transparencia de los films se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Han & Floros (1997) (Ec. 3.1).

$$\text{Transparencia} = \frac{A_{600}}{e} \quad (3.1)$$

Donde,  $A_{600}$  es la absorbancia de las películas a una longitud de onda de 600 nm medida como se describió en el inciso anterior y  $e$  es el espesor de las películas en mm. Así la transparencia se expresa en  $\text{mm}^{-1}$ .

Por otra parte, en este trabajo de Tesis, la opacidad de las películas, en AU x nm, se calculó de acuerdo a la ecuación propuesta por Gontard & Guilbert (1994) como:

$$\text{Opacidad} = A_{500} \times e \quad (3.2)$$

Donde,  $A_{500}$  es la absorbancia de las muestras a 500 nm medida como se describió en el inciso anterior, y  $e$  es el espesor del material (mm). Es importante mencionar que existen discrepancias en la literatura en relación a la determinación de la opacidad de los materiales. Así, otros autores, como Piermaria y col. (2011), estimaron la opacidad como el área bajo la curva en la región comprendida entre 400 y 800 nm, no considerándose en este caso el efecto del espesor de las películas.

### 3.2.3.5 Capacidad y resistencia del termosellado

El termosellado es un proceso a través del cual un material termoplástico se une a otro mediante la acción combinada de calor y presión. Se puede realizar con materiales termoplásticos monocapas o que tienen varias capas (denominados multicapas), siendo al menos una termoplástica. Mediante termosellado pueden unirse tanto materiales similares entre sí como de diferente naturaleza, uno de los cuales debe tener al menos una capa termoplástica.

La capacidad de termosellado de una película es una de las propiedades más importantes de los materiales utilizados para fabricar envases flexibles siendo fundamental la resistencia del cierre para mantener la integridad del mismo.

Cuando dos películas flexibles se termosellan de forma adecuada se produce un entrelazamiento molecular entre las cadenas poliméricas de las matrices individuales de tal forma que desaparece la interfase y se obtiene una capa homogénea lo que le confiere alta resistencia al cierre.

Los métodos más utilizados para termosellar películas flexibles son el de barra caliente y el de impulsos, en los cuales difiere el sistema de calentamiento de la herramienta, es decir, del sellador térmico. En el primero, el calentamiento es continuo, mientras que en el de impulsos es discontinuo.

Independientemente del método utilizado, el cierre debe presentar integridad y resistencia mecánica. La integridad del sellado impide la entrada de microorganismos y garantiza que la barrera a los gases y al vapor de agua del material no se vea comprometida por el sistema de termosellado. Por otra parte, la resistencia mecánica del sellado debe ser suficiente para resistir las sollicitaciones mecánicas derivadas del propio acondicionamiento del producto, transporte, distribución y manipulación del envase.

Los tipos de fallas que pueden aparecer en el sellado por calor cuando es sometido a tracción, se encuentran descritos en la norma ASTM F88-00 (Fig. 3.2).

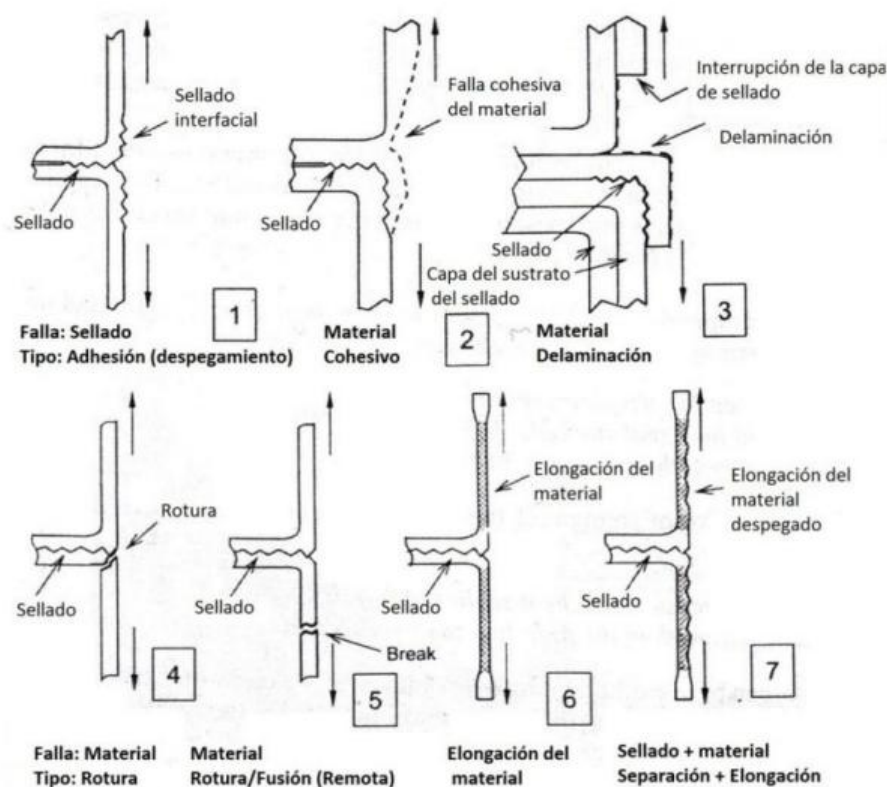


Figura 3.2: Tipos de Fallas en materiales termosellados, de acuerdo a la norma ASTM F88-00.

El ensayo de resistencia del material termosellado se realizó en un ambiente con temperatura y humedad relativa controladas, a 25°C y 50% de HR, en un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra) con un sistema de mordazas de tensión A/TG y una celda de carga de 5 kg. Las muestras acondicionadas se cortaron en probetas

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

---

rectangulares de 6 cm x 0.7 cm de ancho, y se sellaron a 5 mm del extremo con una selladora manual de impulso Lipari C400 (Argentina) (Fig. 3.3). El texturómetro se programó para un ensayo de tracción, a una velocidad de ensayo de 1 mm/s. Se colocaron las muestras selladas en las mordazas de forma que el sellado quede ubicado en el centro (Fig. 3.4). Se analizaron 10 probetas de cada formulación.



Figura 3.3: Muestra sellada para el ensayo de resistencia del sellado. Adaptado de Das y col. (2016).

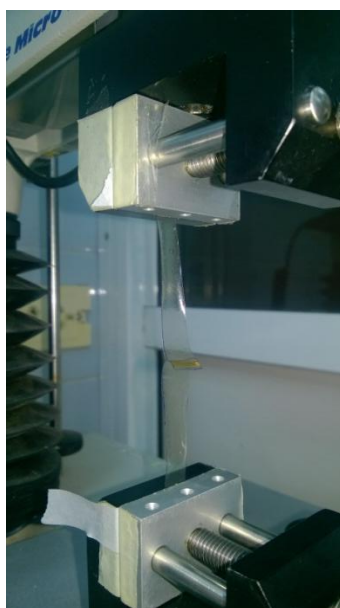


Figura 3.4: Disposición de las muestras en las mordazas A/G en texturómetro para ensayo de resistencia del termosellado.

A partir de los resultados obtenidos, se determinó la resistencia máxima y la resistencia media calculados como la fuerza máxima (N) y la fuerza media (N), respectivamente, y se registró el tipo de falla de cada formulación, de acuerdo a la norma ASTM F88-00.

### 3.2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó como se describió en el capítulo anterior, sección 2.2.5.

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Reología de las suspensiones formadoras de films

En la Fig. 3.5 se presentan las curvas de comportamiento de flujo de las suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz, quitosano (MPM) o la mezcla de ambos. Independientemente del tipo de quitosano utilizado, todas las SFF de las formulaciones compuestas presentaron un comportamiento pseudoplástico con  $n < 1$ , el que se ajustó satisfactoriamente al modelo de Ostwald de Waele (Tabla 3.2). Se observó que a medida que aumentó el contenido de quitosano en la formulación, aumentó el valor del índice de comportamiento de flujo ( $n$ ).

Por otra parte, los valores de viscosidad aparente de las suspensiones fueron intermedios entre los de las SFF de un solo componente y menores a la viscosidad de las respectivas soluciones de quitosano 100Q (Tabla 3.2), lo cual facilita la manipulación de las SFF en la etapa de moldeo.

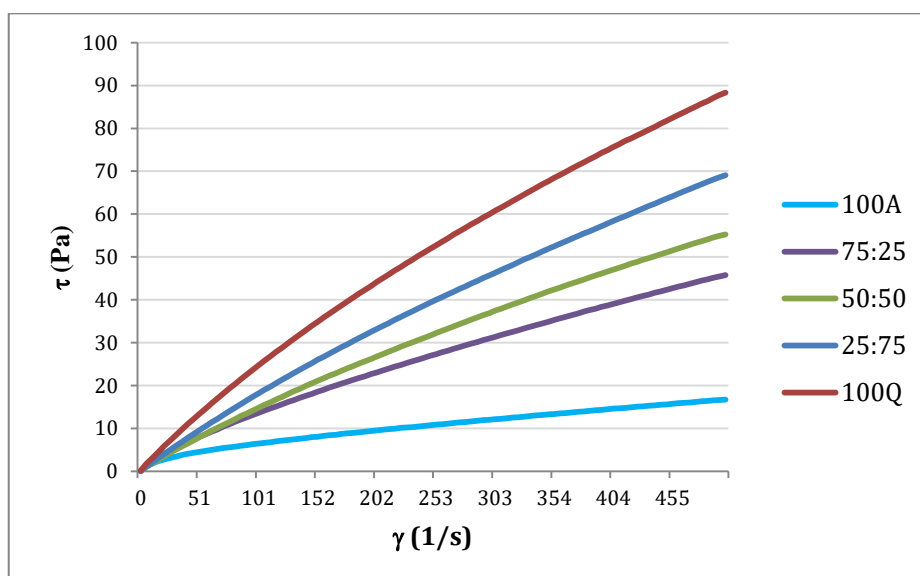


Figura 3.5: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo  $\tau$  (Pa) en función de la velocidad de rotación  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ), para películas compuestas. La nomenclatura de las formulaciones compuestas se corresponde a la Tabla 3.1.

Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

Tabla 3.2: Parámetros reológicos de suspensiones filmogénicas formuladas con almidón de maíz y quitosano de bajo y medio peso molecular (BPM y MPM) en distintas proporciones obtenidas con el modelo matemático de Ostwald de Waele.

Quitosano	Suspensión Formadora de Films (SFF)	$r^2$	Índice de consistencia $k$ (Pa s <sup>-n</sup> )	Índice de comportamiento de flujo $n$ (s <sup>n</sup> )	Viscosidad aparente a 500 s <sup>-1</sup> (mPa s)
MPM	100Q	0.9997	$0.62 \pm 0.04^a$	$0.80 \pm 0.007^b$	$174.46 \pm 2.80^a$
	25:75	0.9998	$0.41 \pm 0.02^b$	$0.83 \pm 0.004^a$	$139.93 \pm 2.09^b$
	50:50	0.9998	$0.34 \pm 0.01^b$	$0.82 \pm 0.003^a$	$110.06 \pm 0.56^c$
	75:25	1	$0.40 \pm 0.02^b$	$0.76 \pm 0.004^c$	$90.09 \pm 2.11^d$
-	100A	0.9998	$0.36 \pm 0.01^{b,1}$	$0.63 \pm 0.005^{d,4}$	$32.89 \pm 2.4^{e,4}$
BPM	100Q	0.9999	$0.10 \pm 0.003^3$	$0.96 \pm 0.005^2$	$80.52 \pm 0.05^1$
	25:75	1	$0.065 \pm 0.001^3$	$0.98 \pm 0.004^1$	$58.46 \pm 0.02^2$
	50:50	1	$0.0713 \pm 0.001^3$	$0.96 \pm 0.003^2$	$55.30 \pm 2.05^2$
	75:25	1	$0.0732 \pm 0.002^2$	$0.90 \pm 0.003^3$	$38.33 \pm 1.59^3$

La nomenclatura de las formulaciones compuestas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Letras (a – e) y números (1 – 4) diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En los espectros mecánicos obtenidos mediante los ensayos dinámicos, se observó que el módulo viscoso fue mayor que el módulo elástico ( $G'' > G'$ ) para todas las formulaciones compuestas, indicando un comportamiento del tipo solución concentrada. A su vez, la incorporación de quitosano en las SFF afectó los valores de ambos módulos; mientras que el módulo viscoso  $G''$  aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) cuanto mayor fue el contenido de Q, el módulo elástico  $G'$  prácticamente no se modificó (Fig. 3.6).

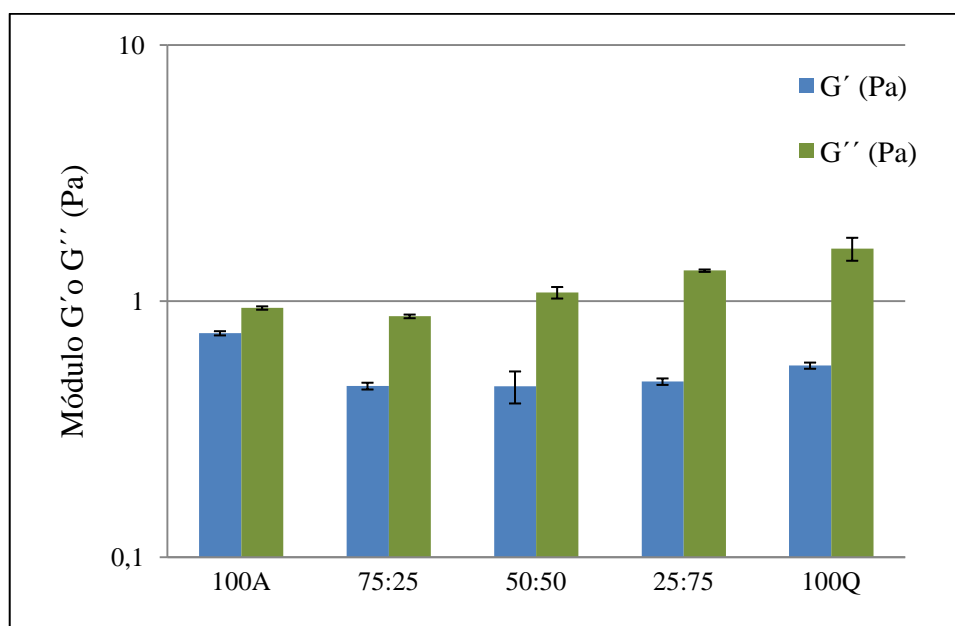


Figura 3.6: Módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) para formulaciones compuestas obtenidos a 1 Hz. La nomenclatura de las SFF corresponde a la Tabla 3.1.

Asimismo se estudió el efecto del tiempo de almacenamiento y la retrogradación de las SFF. En la Fig. 3.7 se muestran las curvas de esfuerzo  $\tau$  (Pa) en función de la velocidad de deformación  $\dot{\gamma}$  ( $s^{-1}$ ), para una suspensión de almidón gelatinizada y para una suspensión compuesta (en este caso, la mezcla 25:75 obtenida con quitosano BPM) a tiempo 0 y luego de 24 horas desde su preparación.

Se observó que la incorporación de quitosano en las suspensiones disminuyó el área entre las curvas ascendente y descendente, y por lo tanto, disminuyó la tixotropía de las muestras, lo que indica una menor retrogradación de las mismas. Este comportamiento se observó para todas las formulaciones compuestas independientemente del tipo de quitosano utilizado.

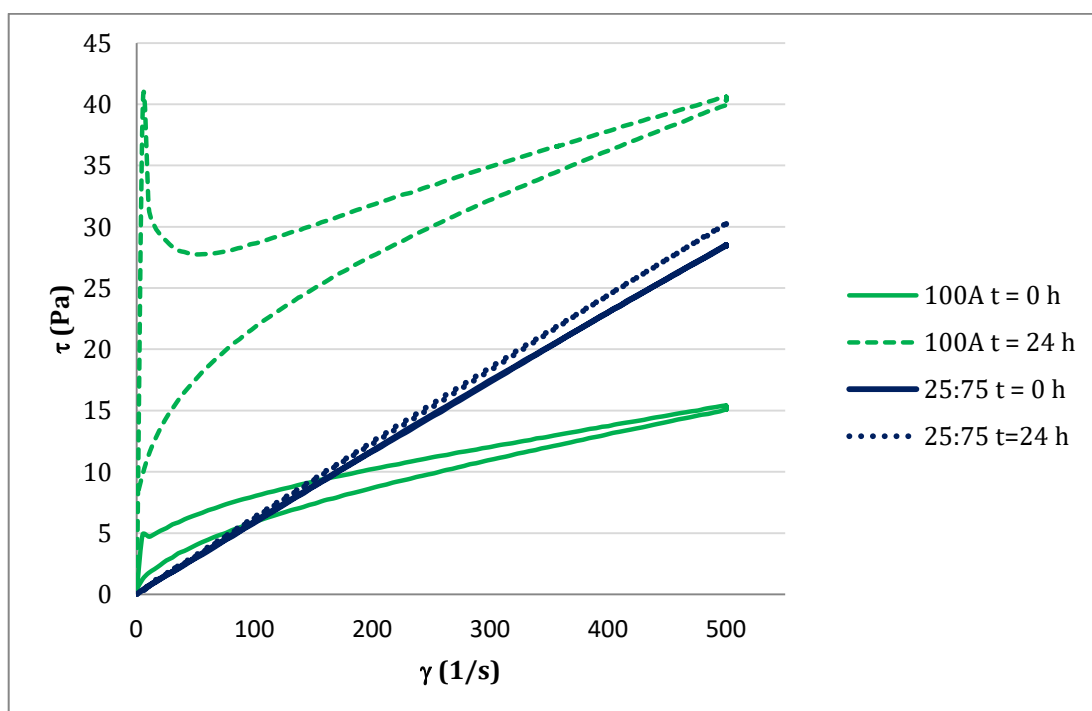


Figura 3.7: Curvas de comportamiento de flujo, esfuerzo  $\tau$  (Pa) en función de la velocidad de deformación  $\gamma$  ( $s^{-1}$ ), para una suspensión filmogénica de almidón y una SFF compuesta, recién preparada (0 h) y a luego de 24 horas.

La característica más importante a destacar de los análisis de reología realizados, es que la incorporación de Q en las suspensiones, minimiza la retrogradación de las suspensiones gelatinizadas de almidón lo que se evidencia en los menores valores de tixotropía obtenidos. Esto significa que al utilizar quitosano, mejora la estabilidad de las suspensiones filmogénicas almacenadas en condiciones de refrigeración. Desde el punto de vista tecnológico este hecho resulta más que relevante ya que impactará directamente en el escalado del proceso y permitiría trabajar con soluciones preparadas con anterioridad.

### 3.3.2 Propiedades de las películas compuestas

En la Tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos para las determinaciones de humedad, espesor, permeabilidad al vapor de agua (PVA) y solubilidad de las películas formuladas con quitosano BPM. La humedad del material aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) con el contenido de quitosano en la formulación. La misma tendencia se observó



### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

---

para la solubilidad en agua a 25°C, debido al mayor carácter hidrofílico del quitosano empleado. Por otra parte, si bien se utilizó la misma relación de moldeo (peso de SFF por área de la placa) se registraron diferencias en el espesor de las matrices compuestas. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas compuestas presentó valores intermedios a los de las películas de un solo componente (AM y Q) (Tabla 3.3), debido principalmente a las interacciones desarrolladas entre ambos polímeros, que reducen la disponibilidad de los grupos hidrofílicos de las matrices de quitosano.

Tabla 3.3: Propiedades de las películas compuestas obtenidas con quitosano BPM.

Formulación	Humedad (%)	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	PVA x $10^{10}$ ( $\text{g m}^{-1} \text{Pa}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Solubilidad 25°C (%)
100A	$16.01 \pm 0.73^{\text{e}}$	$78.69 \pm 4.85^{\text{a}}$	$1.715 \pm 0.452^{\text{c}}$	$14.02 \pm 0.66^{\text{e}}$
75:25	$19.29 \pm 1.45^{\text{d}}$	$82.26 \pm 4.43^{\text{a}}$	$3.404 \pm 0.204^{\text{b}}$	$40.20 \pm 1.35^{\text{d}}$
50:50	$21.81 \pm 0.15^{\text{c}}$	$70.51 \pm 5.51^{\text{b}}$	$2.200 \pm 0.046^{\text{c}}$	$58.72 \pm 2.97^{\text{c}}$
25:75	$27.45 \pm 1.10^{\text{b}}$	$58.22 \pm 8.42^{\text{c}}$	$2.217 \pm 0.157^{\text{c}}$	$73.86 \pm 5.71^{\text{b}}$
100Q	$31.55 \pm 0.88^{\text{a}}$	$74.37 \pm 15.27^{\text{a,b}}$	$4.141 \pm 0.260^{\text{a}}$	$96.61 \pm 4.79^{\text{a}}$

La nomenclatura de las películas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados obtenidos para las películas compuestas formuladas con quitosano de peso molecular medio (MPM). Las diferencias observadas en los valores de las propiedades para las películas de almidón, en relación a los presentados en la Tabla 3.3, se deben a que para estos ensayos se utilizaron almidones de maíz de diferente partida. Independientemente, se verificó la misma tendencia en la humedad de las películas.

El espesor de las películas compuestas fue menor que el de los materiales de un solo componente, obteniéndose en todos los casos materiales con espesores menos homogéneos, como lo indican los valores de desviación estándar.

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

El tipo de quitosano utilizado en la formulación afectó principalmente a la solubilidad y en menor medida a la permeabilidad al vapor de agua. Las diferencias encontradas se explican considerando los valores de ambas propiedades para las películas de quitosano (BPM > MPM).

Tabla 3.4: Propiedades de las películas compuestas obtenidas con quitosano MPM.

Formulación	Humedad (%)	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	PVA $\times 10^{10}$ ( $\text{g m}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	Solubilidad 25°C (%)
100A	$18.634 \pm 7.360^c$	$95.00 \pm 15.03^a$	$2.365 \pm 0.136^b$	$14.017 \pm 0.662^b$
75:25	$24.558 \pm 0.201^{b,c}$	$70.77 \pm 12.30^c$	$2.200 \pm 0.382^b$	$20.715 \pm 1.446^a$
50:50	$26.753 \pm 0.735^{a,b,c}$	$80.36 \pm 11.38^b$	$2.314 \pm 0.087^b$	$9.973 \pm 1.343^c$
25:75	$33.907 \pm 2.858^{a,b}$	$75.19 \pm 10.51^{b,c}$	$2.165 \pm 0.207^b$	$15.094 \pm 1.647^b$
100Q	$41.741 \pm 2.820^a$	$96.81 \pm 10.86^a$	$3.378 \pm 0.113^a$	$15.510 \pm 1.708^b$

La nomenclatura de las películas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Santacruz y col. (2015) trabajaron con mezclas de quitosano de bajo peso molecular y almidón de papa o de mandioca. Estos autores reportaron valores de PVA y de solubilidad menores que los presentados en este trabajo para el mismo tipo de quitosano, lo cual puede atribuirse a la fuente botánica de almidón utilizada.

La tendencia creciente en el contenido de humedad y en la PVA de las películas al aumentar el contenido de quitosano en la formulación, independientemente de su peso molecular, también fue observada por otros autores. Bonilla y col. (2013) encontraron que la incorporación de quitosano APM en formulaciones de películas con almidón de trigo, provocaba esta tendencia creciente en los valores PVA y en el contenido de humedad de los films, debido a la mayor cohesión en la matriz de quitosano comparado con la matriz de almidón, dando como resultado mayores fuerzas intermoleculares. A su vez, mediante enlaces de puente de hidrógeno esta matriz de quitosano incorpora moléculas de agua

formando una red cooperativa. Por lo tanto, este aumento en la PVA se puede asociar con la mayor capacidad de unión de moléculas de agua por parte del quitosano.

De igual manera, Bourtoom & Chinnan (2008) encontraron que la PVA de películas compuestas aumentaba con el contenido de quitosano en la formulación, lo que atribuyeron a la mayor hidrofiliidad (grupos  $\text{NH}_3^+$ ) cuando aumentó la proporción de quitosano en los films. Sin embargo, otros autores (Pelissari y col., 2009; Ren y col., 2017; Dang & Yoksan, 2016) encontraron que la incorporación de quitosano en las formulaciones provoca una disminución de la PVA de las películas compuestas, comparado con la permeabilidad de películas de almidón. Este comportamiento lo atribuyeron a que la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  del quitosano y los grupos  $\text{OH}$  del almidón reduce la disponibilidad de los grupos hidrofílicos para unirse al agua.

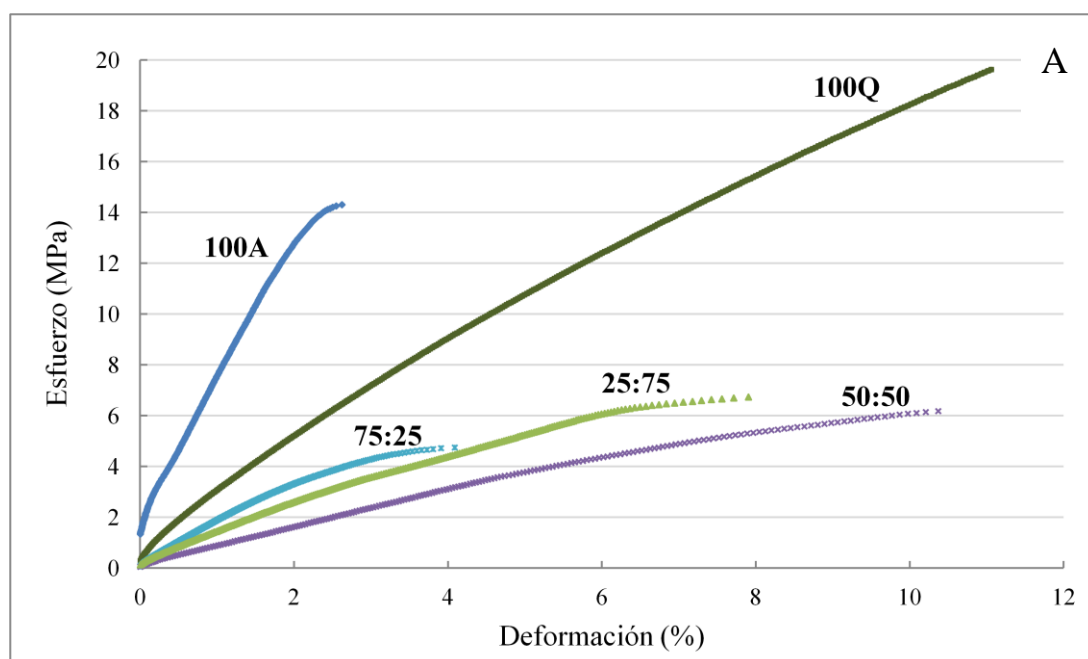
Con respecto a la solubilidad de las películas, Ren y col. (2017) informaron valores de solubilidad más altos para almidón de maíz ( $22.35 \pm 0.15\%$ ) que los presentados en este trabajo. Asimismo estos autores encontraron que la solubilidad aumentaba con el contenido de quitosano en las formulaciones, lo que concuerda con los resultados obtenidos para quitosano BPM.

Resulta además interesante la comparación de las propiedades de las películas biodegradables obtenidas con las del polietileno de baja densidad (LDPE), que es el polímero más comúnmente utilizado para envases sellados, y que presenta como ventajas su bajo costo y baja temperatura de sellado. Si se comparan los valores de PVA de las películas formuladas con la del LDPE ( $1.78 \pm 0.29 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}$ , Dias y col., 2013), se advierte que la capacidad de barrera al vapor de agua es un orden mayor que para el film comercial, como era de esperar por la naturaleza hidrofóbica del material sintético. Sin embargo la solubilidad de los materiales biodegradables sería una ventaja, frente a los sintéticos, para aplicaciones de envases comestibles (ya que ambos componentes son GRAS), los que podrían utilizarse por ejemplo en el porcionado de alimentos en bolsas hervidoras.

Por otra parte, el análisis de las propiedades mecánicas a la tracción de las películas se realizó a través de ensayos complementarios en DMA y en texturómetro, considerando así la respuesta del material sometido a pequeñas y grandes deformaciones.

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

En la Fig. 3.8 se encuentran los perfiles mecánicos de las películas, obtenidos en los ensayos de tensión uniaxial (Fig. 3.8A) y de tracción (Fig. 3.8B) para formulaciones con quitosano MPM. En general, independientemente del tipo de quitosano utilizado en la formulación las películas biodegradables obtenidas se comportaron como materiales dúctiles, con la característica de ser deformables y flexibles. En este sentido, los materiales biodegradables se asemejan a los sintéticos, como el LDPE, si bien la resistencia mecánica y la elongación de éste son mucho mayores que la de los materiales desarrollados en el presente trabajo de Tesis, como era de esperar. Al respecto, con fines comparativos Plackett (2011) ha informado para el LDPE módulos de Young de 200 MPa, un esfuerzo ténsil de 10 MPa y una elongación a la ruptura del 600%, siendo ésta la característica mecánica distintiva de este material.



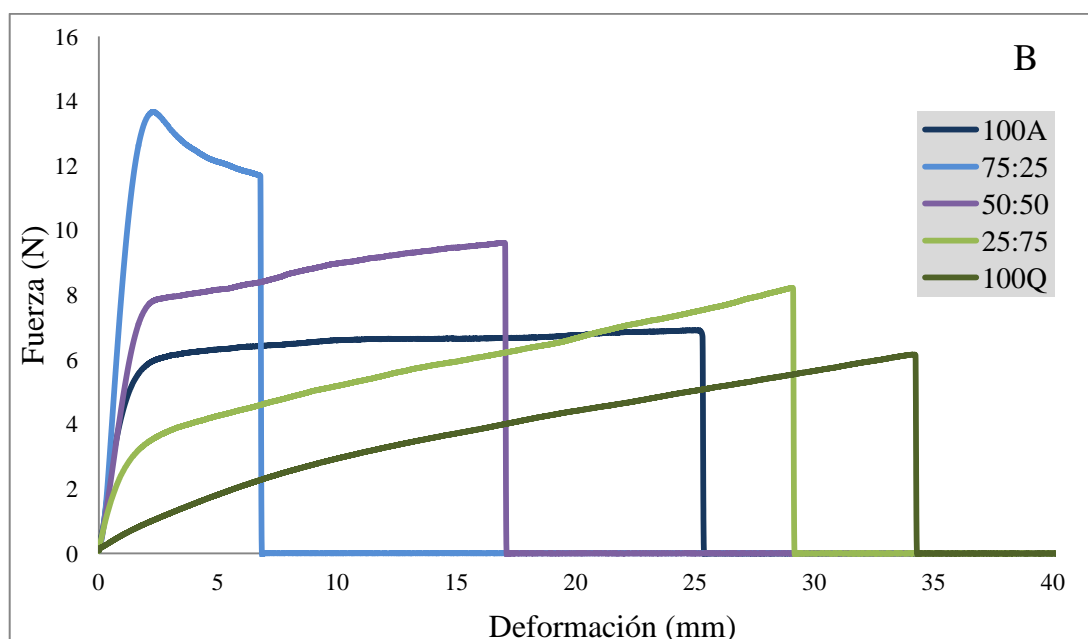


Figura 3.8: Perfiles mecánicos de las películas de almidón, quitosano MPM y compuestas.

A: Perfil de ensayos de tensión uniaxial DMA; B: Perfil de ensayos de tracción con texturómetro. La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

Las propiedades mecánicas a la tracción de las películas obtenidas dependieron del tipo de ensayo realizado. Los ensayos cuasiestáticos a pequeñas deformaciones (DMA) mostraron que, para matrices de un solo componente, las películas de quitosano resultaron más flexibles y tenaces que las de almidón, comportamiento evidenciado por los mayores valores de esfuerzo ténsil y de elongación a la ruptura aunque con menores valores de módulo elástico. Mientras que para las películas compuestas si bien se observó que todas tenían resistencia relativamente comparable, las matrices con 50% de ambos componentes presentaron la mayor elongación, (Fig. 3.8A).

Por otra parte, en los ensayos realizados a grandes deformaciones (Fig. 3.8B) las películas de almidón resultaron más resistentes (mayor esfuerzo ténsil y módulo elástico) que las de quitosano (con mayor elongación a la ruptura). En los materiales compuestos la formulación afectó el comportamiento mecánico, siendo más resistentes las películas con mayor proporción de almidón (75:25 y 50:50), lo que podría explicarse considerando las interacciones entre ambos polímeros en la matriz, que conllevan a una estructura más fuerte. Las películas 25:75 presentaron un comportamiento intermedio al de las matrices de

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

---

un solo componente. La compatibilidad polimérica, así como las interacciones entre ambos componentes se demostró en el capítulo anterior a través de los estudios de FTIR.

Respecto al efecto del tipo de quitosano empleado, se observó una tendencia similar a la descrita en el Capítulo 2, en la Tabla 3.5 se presentan los resultados obtenidos para las películas formuladas con quitosano de bajo peso molecular (BPM) obtenidos mediante ensayos en texturómetro.

Tabla 3.5: Parámetros mecánicos a la tracción obtenidos mediante ensayos en texturómetro para películas formuladas con quitosano BPM.

Película AM:Q	TS (MPa)	E (MPa)	EB (%)
100A	9.79 ± 2.30 <sup>d</sup>	34.67 ± 14.49 <sup>c</sup>	29.14 ± 19.54 <sup>c</sup>
75: 25	27.83 ± 4.44 <sup>a</sup>	130.48 ± 16.95 <sup>a</sup>	9.61 ± 5.26 <sup>d</sup>
50:50	17.49 ± 3.11 <sup>b</sup>	56.83 ± 19.55 <sup>b</sup>	24.07 ± 7.94 <sup>c</sup>
25:75	13.89 ± 3.12 <sup>c</sup>	15.39 ± 4.96 <sup>d</sup>	44.40 ± 10.17 <sup>b</sup>
100Q	9.00 ± 1.76 <sup>d</sup>	2.71 ± 0.36 <sup>e</sup>	58.67 ± 10.16 <sup>a</sup>

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1. TS: esfuerzo de tensión; E: módulo de Young; EB: elongación a la ruptura. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

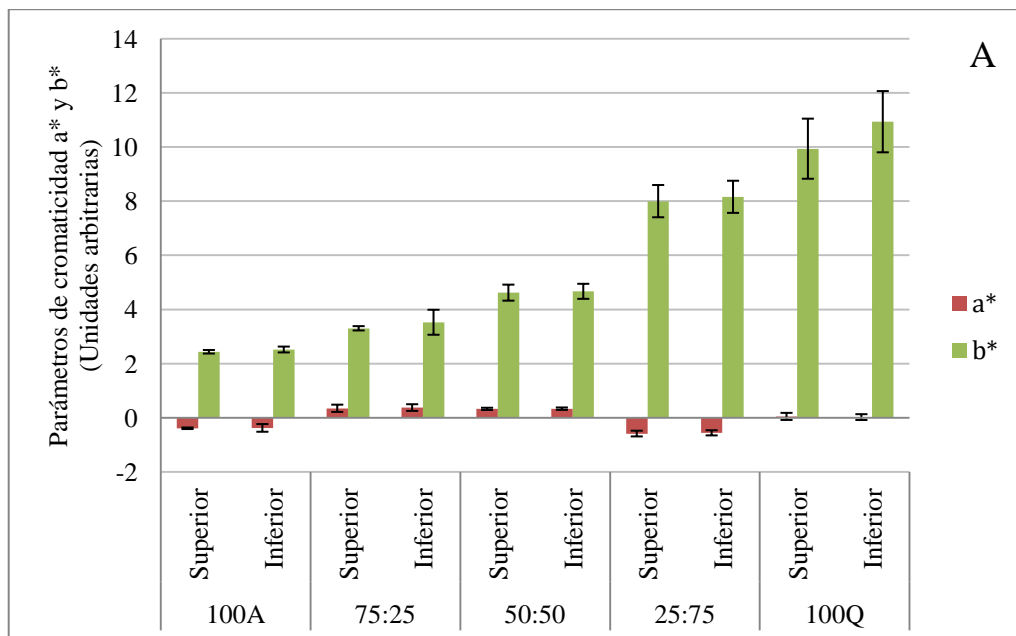
En base a los resultados obtenidos en las propiedades analizadas para los materiales desarrollados se seleccionó el quitosano de peso molecular medio (MPM). Las SFF obtenidas a partir de éste manifestaron características reológicas que indican la fácil manipulación de las mismas durante el moldeo. Además, las películas presentaron mejores propiedades de barrera al vapor de agua que las BPM. En cuanto al comportamiento mecánico las formulaciones compuestas, presentaron características mecánicas interesantes para el desarrollo de envases, como son su resistencia y tenacidad. Por lo tanto, se considera que el quitosano MPM resulta el más apropiado para la formulación de películas

biodegradables y de aquí en adelante en el presente trabajo de Tesis los resultados presentados corresponden a formulaciones con este tipo de quitosano.

### 3.3.3 Propiedades relevantes para el desarrollo de envases biodegradables

#### 3.3.3.1 Propiedades ópticas: color

En la Fig. 3.9, se presentan los resultados de las mediciones de color de las películas compuestas (AM:Q) para las caras superior (en contacto con el aire) e inferior (en contacto con la placa) durante el proceso de secado.



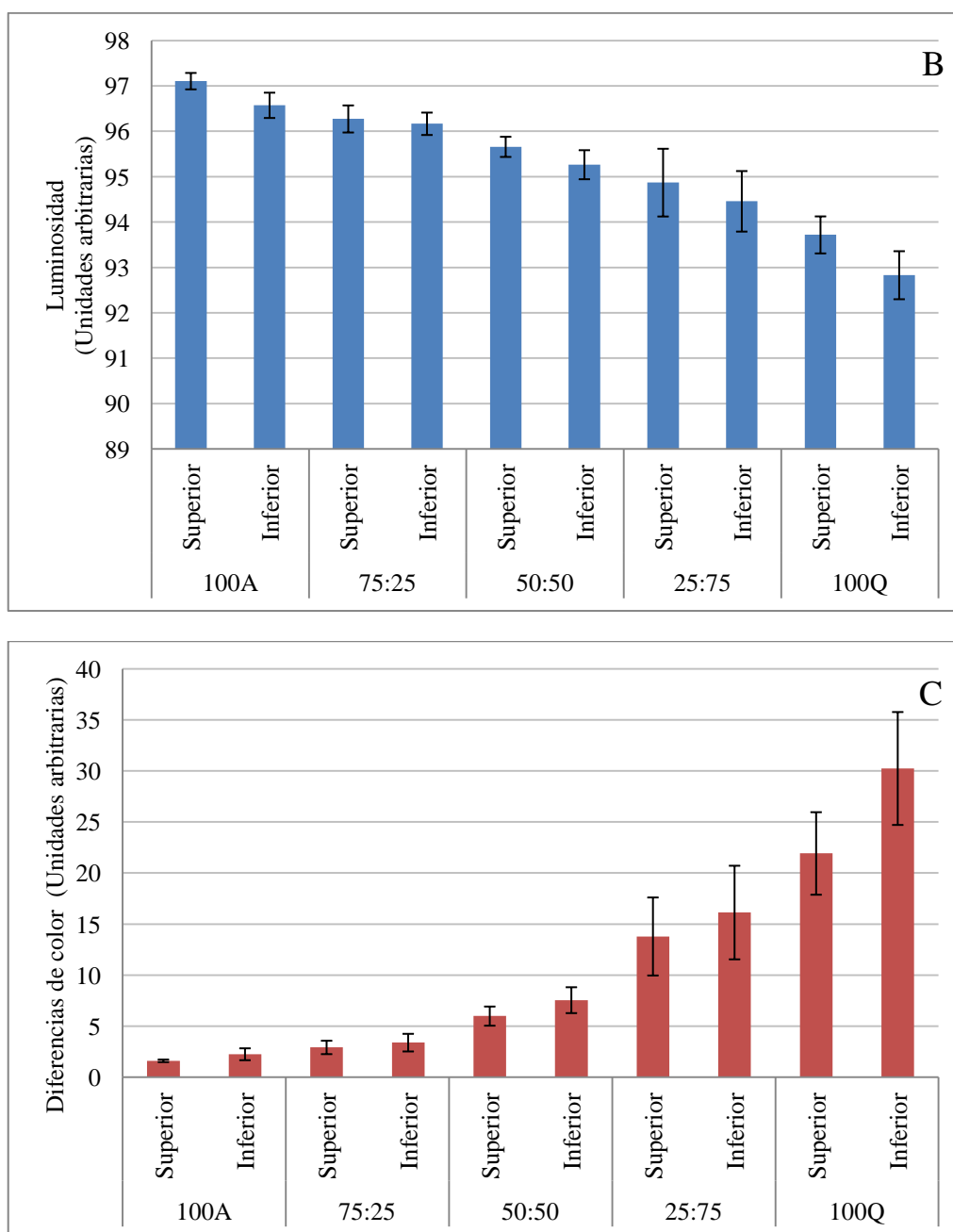


Figura 3.9: Parámetros de color en películas compuestas. A: parámetros de cromaticidad  $a^*$  y  $b^*$ ; B: Luminosidad; C: Diferencias de color  $\Delta E$ . La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

Las películas obtenidas resultaron transparentes, siendo incoloras las formuladas con almidón y con leve tonalidad amarillenta las de quitosano (valores de  $b^*$  positivos). Se



encontró que la composición de las películas afectó significativamente la coloración de las mismas. Estas diferencias se vieron reflejadas en los parámetros de color ya que los valores del parámetro de cromaticidad  $b^*$  y las diferencias de color ( $\Delta E$ ) aumentaron con el agregado de quitosano a la formulación (Fig. 3.9 A y C). Como se mencionó en el Capítulo II, la coloración típica de las películas de quitosano se atribuye a reacciones de Maillard entre los grupos amino e hidroxilo de las cadenas poliméricas (López y col., 2014).

Con respecto al efecto del secado de las películas, se observó que el parámetro de luminosidad  $L$  presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores encontrados para las caras superior e inferior en algunas formulaciones resultando más luminosas las caras en contacto con el aire (Fig. 3.9B). Considerando el uso del material para la fabricación de envases esta característica resulta relevante ya que condicionaría la apariencia del producto envasado y en consecuencia podría influir en la decisión de aceptación del mismo por parte de los consumidores.

### **3.3.3.2 Capacidad de barrera al UV, transparencia y opacidad**

La transmisión de luz del envase puede afectar la calidad del alimento, ya que puede incidir en el desarrollo de reacciones indeseables, especialmente las catalizadas por la luz UV como la oxidación de los lípidos.

En la Fig. 3.10 se observan los espectros de absorbancia de las películas de un solo componente y las formuladas con distinta proporción de AM y Q.

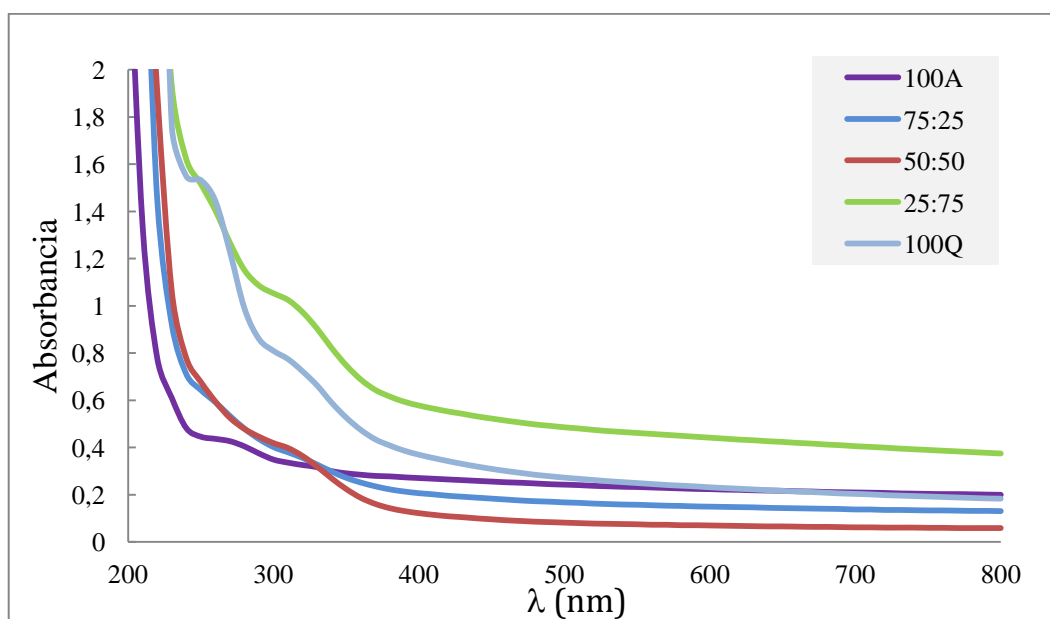


Figura 3.10: Espectro de absorción de películas de un solo componente y películas compuestas. La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

Todos los materiales formulados bloquearon la transmisión de luz ultravioleta en el rango de 200 a 300 nm (Tabla 3.6); y este efecto fue dependiente de la composición del material, siendo más pronunciado cuanto más quitosano posee el film. Esta característica se atribuye a la transición electrónica que exhiben principalmente los grupos amino del quitosano. Estos resultados indican que las películas formuladas con mezclas de ambos polímeros serían útiles para la fabricación de envases destinados a compuestos susceptibles a la oxidación como los ricos en lípidos o para la preservación de compuestos activos en productos mínimamente procesados ya que las reacciones detrimentales de la calidad son en general catalizadas por la luz UV.

Tabla 3.6: Capacidad de barrera al UV de películas compuestas.

Formulación AM:Q	Capacidad Barrera UV (Au x nm)
100A	81.78 ± 6.91 <sup>b</sup>
75:25	113.14 ± 11.52 <sup>b</sup>
50:50	143.81 ± 12.73 <sup>b</sup>
25:75	309.80 ± 3.97 <sup>a</sup>
100Q	405.09 ± 11.31 <sup>a</sup>

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Se encontraron diferencias, aunque éstas no fueron significativas, en los valores de opacidad y transparencia de las distintas películas (Tabla 3.7). A medida que aumentó el contenido de quitosano, más transparentes fueron los materiales. De forma similar, Rivero (2012) encontró que la transparencia de películas a base de gelatina, aumentaba con la presencia de quitosano en la formulación.

La opacidad también varió para las distintas películas, mostrando una tendencia opuesta a la transparencia como era de esperar, siendo los materiales más opacos los que contenían mayor proporción de almidón en su formulación. Sin embargo, Reesha y col. (2015) señalaron que la incorporación de quitosano en formulaciones compuestas con LDPE provocaba una disminución de la transparencia de las películas.

Tabla 3.7: Transparencia y opacidad de películas con distinta proporción de AM y Q.

Formulación AM:Q	Transparencia (mm <sup>-1</sup> )	Opacidad (mm)
100A	20.00 ± 3.52 <sup>a</sup>	13.85 ± 2.28 <sup>a</sup>
75:25	24.67 ± 0.86 <sup>a</sup>	12.85 ± 0.45 <sup>a,b</sup>
50:50	28.25 ± 1.22 <sup>a</sup>	10.99 ± 0.62 <sup>a,b</sup>
25:75	26.77 ± 0.46 <sup>a</sup>	9.07 ± 0.34 <sup>a,b</sup>
100Q	32.72 ± 14.97 <sup>a</sup>	8.68 ± 3.50 <sup>b</sup>

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los valores de opacidad son similares a los del film comercial de LDPE ( $10.55 \pm 0.25$ , Dias y col., 2013). Asimismo, los resultados de opacidad encontrados son menores que los informados por otros autores para películas de quitosano y goma guar (Rao y col., 2010).

### 3.3.3.3 Propiedades mecánicas a la punción

En la Tabla 3.8 se muestran los resultados del ensayo de punción para las películas compuestas y de un solo componente.

Tabla 3.8: Propiedades mecánicas a la punción de películas compuestas (AM:Q).

Película AM:Q	Fuerza máxima (N)	Deformación (mm)	Tenacidad (N mm)
100A	5.85 ± 0.63 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.11 <sup>d</sup>	4.87 ± 0.8 <sup>c</sup>
75:25	9.86 ± 1.46 <sup>a,b</sup>	1.31 ± 0.28 <sup>d</sup>	6.56 ± 2.38 <sup>c</sup>
50:50	10.81 ± 1.08 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.29 <sup>c</sup>	12.65 ± 2.05 <sup>b</sup>
25:75	9.41 ± 0.65 <sup>b</sup>	3.13 ± 0.31 <sup>b</sup>	14.34 ± 1.62 <sup>b</sup>
100Q	9.65 ± 1.24 <sup>a,b</sup>	3.66 ± 0.17 <sup>a</sup>	17.38 ± 2.89 <sup>a</sup>

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1. Los valores reportados corresponden al valor medio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La resistencia a la punción, evaluada a través del parámetro de fuerza máxima fue mayor para las películas de quitosano que para las de almidón. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores de fuerza máxima para las películas compuestas. Estos resultados indican que el agregado de almidón a la formulación no modifica la resistencia a la punción de las películas compuestas, si bien la deformación aumenta con el contenido de quitosano.

Valores similares de fuerza máxima y deformación ( $F_{\text{máx.}} = 3.4 \pm 1.6 \text{ N}$  y  $d = 1.058 \pm 0.015 \text{ mm}$ ) fueron informados por Vox y col. (2013) para films biodegradables a base de almidón aplicados como mulching de suelo en horticultura. Mientras que Nascimento y col. (2012) y Moreno Toasa (2015) reportaron valores de fuerza máxima y deformación mayores a los presentados en este trabajo de Tesis, para películas biodegradables con mayores espesores. Mali y col. (2004) encontraron que la fuerza máxima y la deformación aumentan con el contenido de glicerol y el espesor de las películas.

Por otra parte la tenacidad del material también aumentó con la proporción de quitosano en la formulación. Así, la tenacidad sigue un comportamiento equivalente a la capacidad de deformación del material durante la punción.

#### **3.3.3.4 Capacidad de termosellado**

Las películas compuestas así como la de almidón de maíz se sellaron térmicamente mediante la técnica de sellado por impulso que se utiliza para sellar los films flexibles sintéticos. En cambio, la película de quitosano no se selló por calor, como era de esperarse, al tratarse de un polímero no termoplástico.

Según Cho y col. (2007), la integridad del envase depende de la calidad del sellado; y éste dependerá de la capacidad de las películas a termosellarse y de establecer interacciones moleculares entre los componentes poliméricos, lo que conlleva a crear una nueva capa o estructura homogénea.

Las Fig. 3.11 A y B muestran las curvas típicas del ensayo de resistencia del termosellado y el modo de falla asociado para los films compuestos. Mientras que las películas 25:75 exhibieron ruptura junto al sello (Fig. 3.11A), el resto de las formulaciones de las películas compuestas presentaron falla adhesiva (Fig. 3.12B).

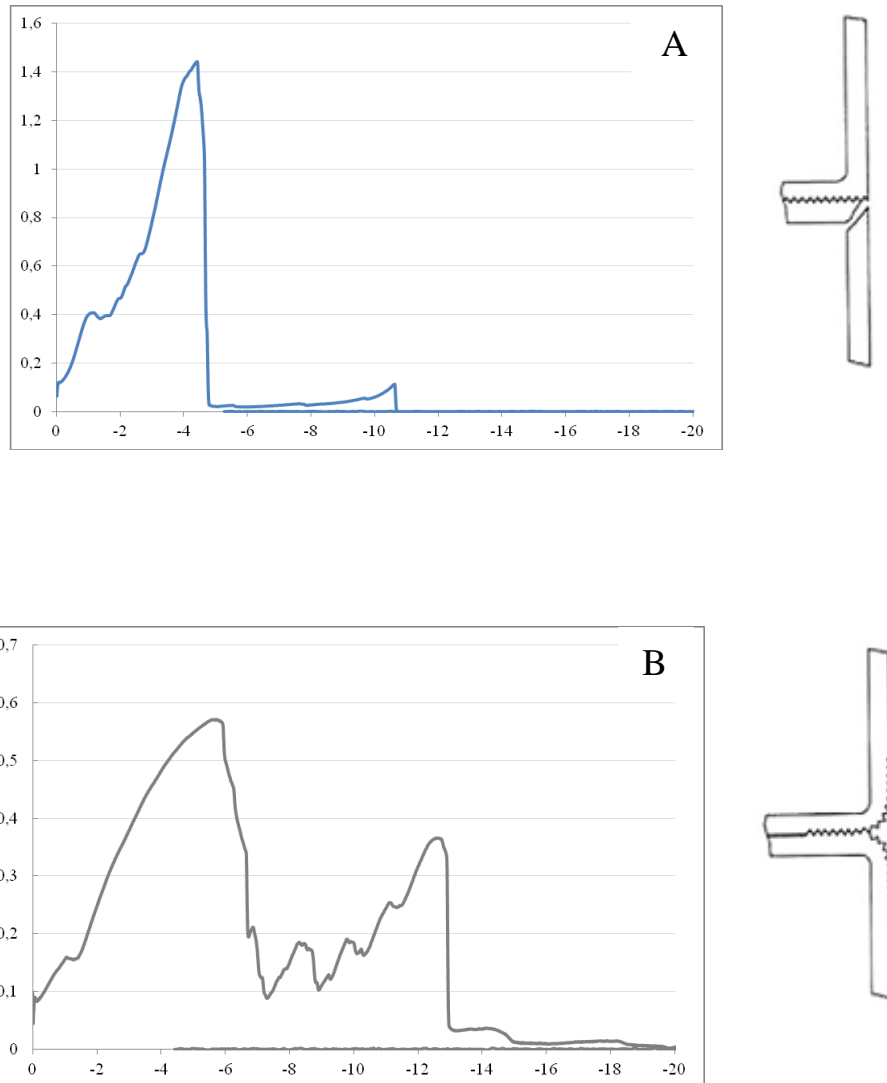


Figura 3.11: Curvas de resistencia del termosellado [F máxima (N) vs deformación (mm)] y modo de falla en películas compuestas. A: Perfil mecánico para películas con fallas en el material y ruptura junto al sellado; B: Perfil mecánico para películas con falla adhesiva del cierre.

A modo ilustrativo la Fig. 3.12 muestra una secuencia fotográfica que ejemplifica uno de los modos de falla típicos que se encontró en las películas compuestas: falla adhesiva del cierre. En este tipo de falla del sello, las dos películas se separan en la interfaz (Yuan & Hassan, 2007), produciéndose la delaminación de las mismas. En cambio en la ruptura junto al sello, las películas se rasgan en el borde de la región sellada, mientras que el sello permanece intacto (Das & Chowdhury, 2016).

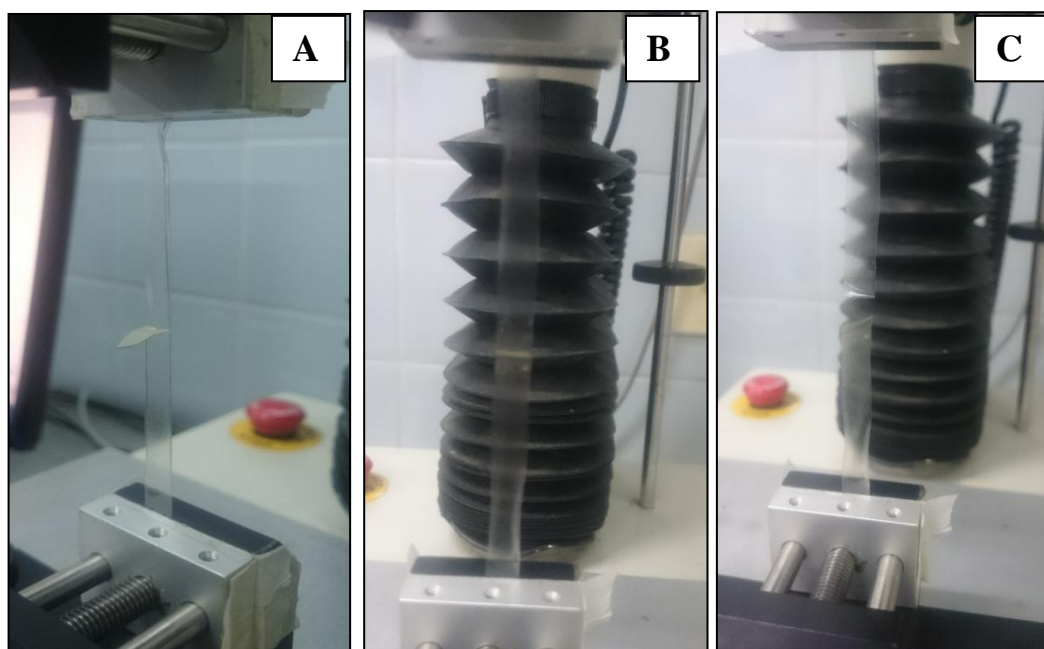


Figura 3.12: Secuencia fotográfica mostrando la falla adhesiva en películas compuestas. A: sello íntegro a tiempo inicial; B: el sello empieza a romperse durante el ensayo; C: ruptura total del sello.

En las películas compuestas, se encontró que la resistencia máxima del sellado disminuyó con el contenido de quitosano en las formulaciones (Tabla 3.9). De igual manera, Reesha y col. (2015) encontraron que la resistencia disminuía con la incorporación de quitosano para películas compuestas con LDPE. López y col. (2011) informaron valores de resistencia similares para almidón de maíz nativo.

Por otra parte, Das & Chowdhury (2016) que determinaron la resistencia del sellado en películas de almidón, y Abdorreza y col. (2011) trabajando con películas de caseína y

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

carragenina, encontraron valores similares de resistencia del sellado (alrededor de 0.11 N/mm) a los obtenidos en el presente trabajo de Tesis. Sin embargo estos valores informados para películas biodegradables son menores a la resistencia de los cierres de films sintéticos, 0.59 N/mm (Yuan y col., 2006).

Tabla 3.9: Resultados del ensayo de resistencia del termosellado para películas de un solo componente y compuestas.

Película	Resistencia máxima (N)	Resistencia media (N)	Tipo de falla
100A	$0.75 \pm 0.16^a$	$0.28 \pm 0.07^a$	Adhesiva
75:25	$0.70 \pm 0.21^{a,b}$	$0.24 \pm 0.15^a$	Adhesiva
50:50	$0.60 \pm 0.20^{a,b}$	$0.27 \pm 0.08^a$	Adhesiva
25:75	$0.47 \pm 0.17^b$	$0.28 \pm 0.08^a$	Adhesiva, ruptura junto al sello
100Q*	-	-	-

\*Las muestras no se termosellaron. Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

#### 3.3.4 Selección de la formulación para el diseño de envases: análisis de costos de materias primas

Con todas las formulaciones compuestas y las películas de AM se pudieron obtener los envases o bolsas, excepto con 100Q ya que éstas matrices no se consiguieron termosellar, como se mencionó anteriormente.

En la Fig. 3.13 se muestra uno de los envases flexibles (bolsas) obtenido por termosellado de dos películas compuestas.





Figura 3.13: Envase flexible (bolsa) obtenido con las películas compuestas termoselladas.

Para la selección de la formulación compuesta, además de tener en cuenta las propiedades analizadas de los materiales se realizó un análisis de costos del envase. Para ello, se consideraron los precios de mercado del almidón de maíz, glicerol y quitosano de peso molecular medio.

- Almidón de maíz, marca Glutal: \$220 x Tn
- Quitosano, marca Parafarm: \$1200 x kg
- Glicerol Kaoking (Guangzhou Kaoking Chemical Co., China) de uso industrial: x 1kg \$23 (<https://www.alibaba.com/showroom/price-of-glycerol.html>)

En la Tabla 3.10 se presenta el análisis de los costos de materias primas correspondientes a películas a base de almidón, quitosano y sus mezclas. Para calcular el costo de las películas correspondiente a cada formulación se consideró que para obtener 1 m<sup>2</sup> de película, se necesitan 2357.85 g de suspensión filmogénica, es decir, que se trabajó con una relación de moldeo constante de 2.36 kg/m<sup>2</sup>. Así, en función de la composición de cada SFF y de la relación de moldeo, se estimaron los costos de las materias primas.

Tabla 3.10: Contenido y costos de las formulaciones.

Película AM:Q	Masa AM (g)	Masa Q (g)	Masa Glicerol (g)	Costo (\$/m <sup>2</sup> )
100A	93.38	0	23.34	2.40
75:25	70.10	14.60	21.18	19.41
50:50	46.78	29.24	19.00	36.45
25:75	23.41	43.89	16.83	53.53
100Q	0	58.58	14.65	70.63

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

### 3.4 Conclusión

En la Tabla 3.11 se resumen a modo comparativo las principales características de las películas obtenidas, en relación a su aplicación como envases, y los costos derivados.

Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

Tabla 3.11: Resumen y valoración de las propiedades de las películas para su aplicación como envases.

Propiedad	Formulación AM:Q				
	100A	75:25	50:50	25:75	100Q
Solubilidad	--	-	+	++	+++
Barrera al vapor de agua (menor PVA)	+++	+	++	++	-
Barrera UV	-	+	+	++	++
Color	++	++	+	-	--
Transparencia	++	++	++	++	++
Resistencia mecánica a tracción	-	+++	++	+	--
Elongación	+	-	-	++	+++
Resistencia mecánica a la punción	-	+	++	+	+
Capacidad de termosellado	+++	++	++	+	no posee
Resistencia del cierre	+++	+++	++	+	--
Tipo de falla	Adhesiva	adhesiva	adhesiva	Ruptura junto al cierre	no posee
Costo	-	+	++	+++	+++

La nomenclatura de las películas compuestas corresponde a la Tabla 3.1.

Finalmente, considerando las principales características de los sistemas compuestos para su aplicación como envases, así como los costos de las materias primas, se seleccionará la formulación de AM:Q 75:25 como matriz polimérica para su funcionalización y análisis en el capítulo siguiente.

Además se utilizará quitosano de peso molecular medio que, como se mencionó anteriormente, presenta mejores propiedades mecánicas y de barrera comparadas con los otros tipos de quitosano.

### 3.5 Referencias bibliográficas

- Abdorrezza, A.M., Cheng, L.H. & Karim, A.A. (2011). Effects of plasticizers on thermal properties and heat sealability of sago starch films. *Food Hydrocolloids*, 25, 56–60
- American Society for Testing and Materials – ASTM (2001). Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials – ASTM F88-00, vol. 15.09. ASTM Standards on Disc. ASTM, Philadelphia, p.6.
- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. & Chiralt, A. (2013). Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering*, 114, 303–312.
- Bourtoom, T. & Chinnan, M.S. (2008). Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *Food Science and Technology*, 41, 1633-1641.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. & Del Nobile, M.A. (2008). Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88, 159–168.
- Cho, S., Ullsten, H., Gällstedt, M. & Hedenqvist, M. (2007). Heat-sealing properties of compression - molded wheat gluten films. *Journal of Biobased Material and Bioenergy* 1, 56 – 63.
- Cutter, C.N. (2006). Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, 74, 131–142.
- Dang, K.M. & Yoksan, R. (2015). Development of thermoplastic starch blown film by incorporating plasticized chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 115, 575–581.
- Dang, K.M. & Yoksan, R. (2016). Morphological characteristics and barrier properties of thermoplastic starch/chitosan blown film. *Carbohydrate Polymers*, 150, 40–47.
- Das, M. & Chowdhury, T. (2016). Heat sealing property of starch based self-supporting edible films. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 64–68.
- Dias, M. V., Silva de Medeiros, H., Ferreira Soares, N. de F., Ramos de Melo, N., Borges, S. V., Souza Carneiro, J. de D. & Teixeira de Assis Kluge Pereira, J. M. (2013). Development of low-density polyethylene films with lemon aroma. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 167 – 171.

- Forssell, P., Lahtinen, R., Lahelin, M., & Myllärinen, P. (2002). Oxygen permeability of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, 47(2), 125–129.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G. & Georgakis, S. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76, 172–181.
- Gontard, N. & Guilbert, S. (1994). Biopackaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. En M. Mathlouthi (Ed.), *Food packaging and preservation* (pp.159–181). New York: Blackie Academic & Professional.
- Han, J.H. & Floros, J.D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, 13, 287–98.
- Hosseinnejad, M. & Jafari, S.M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467–475.
- Li, H., Gao, X., Wang, Y., Zhang, X. & Tong, Z. (2013). Comparison of chitosan/starch composite film properties before and after cross-linking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 275–279.
- López, O.V., Lecot, C.J., Zaritzky, N.E & García, M.A. (2011). Biodegradable packages development from starch based heat sealable films. *Journal of Food Engineering*, 105, 254-263.
- López, O.V., García, M.A., Villar, M.A., Gentili, A., Rodríguez, M.S., & Albertengo, L. (2014). Thermo-compression of biodegradable thermoplastic corn starch films containing chitin and chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 106-115.
- Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N. & Zaritzky, N.E. (2004). Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 129–135.
- Matet, M., Heuzey, M.C. & Aji, A. (2014). Morphology and antibacterial properties of plasticized chitosan/metallocene polyethylene blends. *Journal of Materials Science*, 49(15), 5427–5440.

- Moreno Toasa, G.A. (2015). Utilización de harina de plátano (*Musa balbisiana*), en el desarrollo de películas biodegradables activas. (Tesis de grado, Universidad técnica de Ambato). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11979/1/AL%20572.pdf>
- Nascimento, T.A., Calado, V. & Carvalho, C.W.P. (2012). Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. *Food Research International*, 49, 588–595.
- Pelissari, F.M., Grossmann, M.V., Yamashita, F. & Pineda, E.A. (2009). Antimicrobial mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7499–7504.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M.A. & Abraham, A.G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25, 1261–1269.
- Plackett, D. (2011). Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Capítulo 4, p. 73.
- Rao, M.S., Kanatt, S.R., Chawla, S.P. & Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1243–1247
- Raquez, J.M., Nabar, Y., Srinivasan, M., Shin, B.Y., Narayan, R. & Dubois, P. (2008). Maleated thermoplastic starch by reactive extrusion. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 159–169.
- Reesha, K.V., Panda, S.K., Bindu, J. & Varghese, T.O. (2015). Development and characterization of an LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 934-942.
- Ren, L., Yan, X., Zhou, J., Tong, J. & Su, X. (2017). Influence of chitosan concentration on mechanical and barrier properties of corn starch/chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1636–1643.
- Rindlava, Å., Hulleman, S.H.D. & Gatenholma, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate Polymers*, 34(1–2), 25–30.

### Capítulo 3. Películas compuestas formuladas con distintas proporciones de quitosano y almidón

---

- Rivero, S. (2012). Estudio y aplicación de películas activas a base de quitosano. (Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata).
- Roller, S., Sagoo, S., Boarda, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. & Fletcher, H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, 62, 165–177.
- Santacruz, S., Rivadeneira, C. & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89-94.
- Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P.J.A. & Gómez-Guillén, M.C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on *chitosan* and *chitosan*-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31, 458-466.
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science and Technology*, 14, 71-78.
- Verlee, A., Mincke, S. & Stevens, C.V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283.
- Vox, G., Santagata, G., Malinconico, M., Immirzi, B., Scarascia Mugnozza, G. & Schettini, E. (2013). Biodegradable films and spray coatings as eco-friendly alternative to petro-chemical derived mulching films. *Journal of Agricultural Engineering*, XLIV(s2): 44, 221-225.
- Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A. & Nag, D. (2005). *Chitosan*–starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21, 185-192.
- Yuan, C.S., Hassan, A., Ghazali, M.I. & Ismail, A.F. (2006). Heat-seal strength analysis of laminated films with HDPE and LDPE sealant materials in bar sealing application. FEIIC seminar on engineering and technology. <http://eprints.uthm.edu.my/2732/1/19.pdf>.
- Yuan, C.S. & Hassan, A. (2007). Effect of bar sealing parameters on OPP/MCPP heat seal strength. *eXPRESS Polymer Letters*, 1(11), 773–779.

# **CAPÍTULO 4**

---

**DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPUESTAS ACTIVAS**



## Capítulo 4: Desarrollo de películas compuestas activas

### 4.1 Introducción

Con el fin de reducir el uso de aditivos químicos en la industria alimentaria, ha crecido el interés por el empleo de compuestos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes que no tienen efectos negativos sobre la salud humana.

El quitosano *per se*, junto con otros productos naturales (extractos de plantas, aceites esenciales, ácidos orgánicos y sus sales derivadas) así como la utilización de microorganismos antagonistas, puede ser muy eficaz para reducir las infecciones fúngicas poscosecha que derivan en las pérdidas por podredumbre (Miranda-Castro, 2016).

Es ampliamente conocido que en diferentes extractos de plantas provenientes de hojas, flores, semillas, raíces y tallos pueden estar presentes estos compuestos antimicrobianos. Las distintas familias de sustancias químicas encontradas en las plantas pueden ser usadas directamente luego de su extracción y purificación, o bien pueden transformarse en derivados con grupos funcionales específicos responsables de una propiedad deseable.

La composición de los aceites esenciales (AE) de plantas pueden variar según las especies, la planta, estación de cosecha y origen geográfico (Teixeira y col., 2013). Además, el método de extracción también puede influir en el tipo y la cantidad de compuestos extraídos.

Algunos autores han descrito los efectos positivos del uso de estos extractos vegetales frente a diversas bacterias y hongos (Sabaghi y col., 2015; Xu y col., 2007; Bautista Baños y col., 2003). En relación con el quitosano, se ha confirmado el efecto sinérgico entre este polímero natural y los aceites esenciales; especialmente con los derivados de limón, tomillo, bergamota, clavo de olor y canela (Bill y col., 2014; Mohammadi y col., 2015; Muñoz y col., 2009; Perdonés y col., 2012; Sánchez-González y col., 2010; Shao y col., 2015; Timóteo-dos Santos y col., 2012).

Por otro lado, se ha demostrado la actividad fungicida de los aceites esenciales en una importante gama de hongos de especial incidencia durante la poscosecha. La mayoría de ellos están clasificados como aditivos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) (Ruiz-Navajas y col., 2013). Sin embargo, su uso como conservantes de alimentos a menudo es limitado debido a su fuerte sabor y aroma que condiciona las propiedades organolépticas de los productos en los que se aplican. Para evitar este problema, se ha recurrido a la encapsulación de los mismos, cuando se incorporan directamente en la matriz alimentaria (Calo y col., 2015; El Asbahani y col., 2015), siendo el desarrollo de

nanoencapsulados una opción prometedora pero aún incipiente (Prakash y col., 2018). Otra alternativa con menor impacto en las características sensoriales del producto es la incorporación de los AE a la formulación de películas comestibles (Ruiz-Navajas y col., 2013) o a películas activas (Remya y col., 2017). Debido su naturaleza lipídica generalmente se incorporan a las suspensiones filmogénicas por emulsificación y se espera que ayuden a reducir la permeabilidad al vapor de agua de los films hidrofílicos.

Así, en el presente trabajo de Tesis se propuso desarrollar películas activas combinando el efecto antifúngico del quitosano con el de productos naturales derivados de la producción regional, que no dañen la salud y respeten el medio ambiente. Teniendo en consideración lo antedicho, se seleccionaron dos componentes naturales provenientes de la industria cítrica local, que son subproductos de la misma: el aceite esencial de limón (AEL) y el extracto de semillas de pomelo (ESP).

Cabe destacar que la citricultura es una de las actividades frutícolas más importantes de nuestro país (SENASA, 2015). Argentina se ubica dentro de los primeros diez productores mundiales de cítricos y es el primer productor y exportador mundial de limones. La mayor parte de la producción de cítricos (limones, mandarinas, naranjas, pomelos) se localiza en las provincias de Tucumán, Entre Ríos y Misiones, constituyendo una parte relevante de su actividad económica. En el caso particular de la Provincia de Entre Ríos, determinadas características tales como el relieve, los suelos arcillosos y el clima templado favorecen el desarrollo de algunas variedades de especies aromáticas, medicinales y oleaginosas, que contienen una gran diversidad de compuestos naturales. La actividad agrícola de la provincia se centra principalmente en el cultivo del algodón, arroz, avena, girasol, limón, lino, maíz, mandarina, naranja, pomelo, soja, sorgo y trigo, destacándose como productora y exportadora de cítricos.

Argentina industrializa prácticamente la mitad (48.13%) de la producción mundial de limones y se encarga de casi la totalidad del procesamiento de limones del hemisferio sur (93.47%), (Fraschina, 2017). Como subproductos del procesamiento del limón se obtienen los AE. Respecto a la producción de pomelos, la fruta que no alcanza los parámetros de exportación o comercialización en fresco, debido a su tamaño, color o forma, se destina al procesamiento, siendo la obtención de extractos de semillas (ESP) una opción novedosa y poco estudiada aún.

En relación a su composición química, el componente principal de los aceites esenciales de limón es  $\alpha$ -limoneno, seguido de  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpinoleno,

terpinen-4-ol, cimeno y, en una menor proporción,  $\epsilon$ -citralina (AL-Jabri & Hossain, 2014). El extracto de semillas de pomelo contiene grandes cantidades de polifenoles y compuestos tales como catequinas, epicatequina, epicatequina-3-O-galato y procianidinas diméricas, triméricas y tetraméricas (Xu y col., 2007a). Asimismo, la acción beneficiosa del uso de ESP se ha atribuido en parte a la actividad antioxidante de los flavonoides cítricos, como la naringenina (Xu y col., 2007a).

El efecto del AEL y del ESP sobre el crecimiento de los microorganismos y su eficiencia contra los hongos ha sido reportada (Xu y col., 2007b). Sin embargo, no se dispone de información cuando estos compuestos activos se incluyen en películas a base de mezclas de almidón de maíz y quitosano o su efecto sobre las propiedades funcionales de la matriz polimérica compuesta.

El objetivo de este capítulo es analizar el efecto de la incorporación de AEL y ESP en películas compuestas formuladas a base almidón y quitosano optimizadas en el Capítulo 3; estudiar sus propiedades funcionales (mecánicas, de barrera y ópticas), así como los cambios estructurales provocados en la matriz polimérica. Se evaluarán además las propiedades antioxidantes de las películas y su actividad antimicrobiana frente a diferentes hongos y bacterias Gram (+) y Gram (-).

### **4.2 Materiales y Métodos**

Se utilizó extracto de semillas de pomelo (ESP) provisto por la empresa Euma S.A.I.C.I y F. (Buenos Aires, Argentina). Por otro lado, se empleó aceite esencial de limón (AEL), el cual fue adquirido de la empresa Litoral Citrus SRL (Concordia, Entre Ríos, Argentina). El quitosano utilizado fue provisto por Parafarm (Argentina) y como ya se mencionó presenta peso molecular medio (MPM). Asimismo se empleó almidón de maíz (Glutal, Argentina) y glicerol (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, Barcelona, España) como agente plastificante.

#### **4.2.1 Caracterización de los compuestos activos**

##### **4.2.1.1 Caracterización del aceite esencial de limón (AEL)**

La caracterización del aceite esencial de limón se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa empleando un cromatógrafo Fisons GC 8060 (Fisons, Italia) equipado con un detector de ionización de llama (GC-FID) y una columna capilar DB-5 de 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno con una película de fase estacionaria no polar HP-5 de 0.25

$\mu\text{m}$  de espesor (J&W Scientific Agilent, Palo Alto, EEUU). Como gas portador se utilizó helio a una velocidad de flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . El horno se programó de la siguiente forma:

- 1- Temperatura inicial  $50^{\circ}\text{C}$ .
- 2- Primera rampa de calentamiento desde  $50^{\circ}\text{C}$  hasta  $130^{\circ}\text{C}$  a  $5^{\circ}\text{C/min}$ .
- 3- Mantenimiento durante 5 min a  $130^{\circ}\text{C}$ .
- 4- Segunda rampa de calentamiento desde  $130^{\circ}\text{C}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C/min}$

Las temperaturas del inyector y del detector fueron seteadas a  $250^{\circ}\text{C}$ .

En primer lugar, se obtuvo la curva de calibración del reactivo patrón. Para esto se utilizaron disoluciones de limoneno (Merck, EE.UU.), como reactivo estándar, en dietil-éter a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm). Luego, con una microjeringa se inyectaron  $2 \mu\text{L}$  de cada disolución en el cromatógrafo gaseoso y se obtuvieron los cromatogramas. A partir de éstos se calculó el área del pico y finalmente se obtuvo la curva de calibración graficando dicha área en función de la concentración de limoneno.

Posteriormente, se preparó una disolución de 0.3 gramos de AEL en 10 mL de éter etílico. Se programó el equipo como se mencionó previamente y se realizó la inyección de  $2 \mu\text{L}$  de la solución. A partir del cromatograma, se obtuvo el área por integración del pico correspondiente al tiempo de retención del limoneno. Con este resultado, se ingresó en la recta de calibrado trazada en el paso previo para el reactivo patrón. Luego, del eje de ordenadas de esta recta se obtuvo la concentración de limoneno en ppm y, finalmente, se calculó el contenido de limoneno en el AEL (mg Limoneno / mg AEL).

La caracterización del AEL se completó por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Se obtuvieron los espectros de la muestra de AEL con un espectrofotómetro IR (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con una celda óptica de platino y un detector RT-D1a TGS, utilizando el modo de reflexión atenuado total (ATR-FTIR). El espectro se registró entre  $4000$  y  $400 \text{ cm}^{-1}$  por acumulación de 64 exploraciones a una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Los datos se analizaron utilizando el software OPUS (Bruker, Karlsruhe, Alemania). Los espectros de absorbancia inicial se atenuaron utilizando un algoritmo de Savitsky-Golay de nueve puntos y se aplicó una corrección elástica de la línea de base (200 puntos). Luego, estos se centraron y normalizaron utilizando el software mencionado anteriormente.

#### **4.2.1.2 Caracterización del extracto de semillas de pomelo (ESP)**

En la Fig. 4.1 se encuentra la ficha técnica provista por el fabricante para el ESP. Como puede observarse de sus características técnicas, se trata de un extracto acuoso alcohólico.

Como parte de la caracterización del extracto de semillas de pomelo, se determinó el contenido de sólidos del producto comercial. Para ello, se realizó una liofilización del producto y por diferencia de masas al inicio y final del proceso, se determinó el contenido de sólidos del ESP.



**euma** s.a.i.c.i. y f.  
 Aceites esenciales, aromáticos, composición para sabores y perfumería  
 Curupaytí 1674/80 (B1607AYV) - Villa Adelina, Buenos Aires, Argentina  
 Tel./Fax: 54-11 4766-5520/64227 4763-8485  
 e-mail: [info@eumasa.com.ar](mailto:info@eumasa.com.ar) site: [www.eumasa.com.ar](http://www.eumasa.com.ar)

**ESPECIFICACIONES ANALÍTICAS**

PRODUCTO: POMELO SEMILLAS extracto fluido
Vida útil: 3 años

<u>NOMBRE BOTÁNICO:</u>	Citrus grandis
<u>FAMILIA:</u>	Rutaceas
<u>PARTE UTILIZADA:</u>	Semillas

ANÁLISIS	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
ASPECTO	Solución límpida	Conforme
COLOR	Parduzco	Conforme
OLOR	Aromático, característico	Conforme
SABOR	Ácido, propio	Conforme
SOLUBILIDAD	Parcialmente soluble en agua y alcohol	Conforme
RESIDUO SECO	5 % - 10 % p/p	Conforme
GRADO ALCOHOLICO	50 % - 60 % v/v	Conforme
DENSIDAD (20° C)	0,850 – 0,990 g/ml	Conforme
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO		
ANÁLISIS	ESPECIFICACION	RESULTADO
SALMONELLA Sp.	Ausencia/10g	Conforme
E. COLI	Ausencia/1g	Conforme

MÉTODOS USADOS:

USP 32 – NF 27 / BR. HERB. PHAR. 4ª Ed. / F. A. 7ª Ed.

ALMACENAJE: Almacenar en envase original bien cerrado, alejado del calor y la luz solar directa

Figura 4.1: Ficha técnica del extracto de semillas de pomelo utilizado.

El perfil de compuestos polifenólicos del ESP se analizó mediante HPLC en fase reversa con un equipo Waters1525 (Waters, Estados Unidos) con bomba binaria y detector DAD 2998 (Waters, Estados Unidos). El análisis cromatográfico se realizó en una columna

Zorbax 300 SB-C18 de 250 x 4,6 mm y 5 µm de diámetro de partícula. La fase móvil “A” consistió en una mezcla de solución de ácido fórmico al 5% y la fase móvil “B” en metanol al 100%. La composición de la fase móvil en gradiente empleada se muestra en la Tabla 4.1. Se trabajó a un caudal de 0.4 mL/min y a una temperatura de 40°C. El volumen de inyección fue de 20 µl.

Tabla 4.1. Composición (% v/v) de la fase móvil empleada en las corridas cromatográficas.

Tiempo (min)	% Solvente A	% Solvente B
0-3	80	20
4-9	50	50
10-27	20	80
28-38	80	20

Se ha informado que los espectros de absorción UV-VIS de los flavonoides muestran dos bandas características una a 330 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y otra a 285 nm relacionada con los grupos benzoílo, (Mabry, 1970). Por esta razón se registraron los cromatogramas obtenidos por HPLC con el detector de arreglo de diodos seteado a estas longitudes de onda, además de realizar los registros a 380 nm, longitud de onda de máxima absorción de la rutina. Se utilizaron los siguientes compuestos como estándares para la identificación de los polifenoles presentes en el extracto líquido: rutina, quercetina, catequina y los ácidos clorogénico, siríngico, hidroxibenzoico, vanílico, caféico, cumárico, gálico y cinámico (Sigma-Aldrich, Argentina).

La muestra de ESP se analizó por duplicado y los compuestos estándar se inyectaron por separado para determinar los tiempos de retención.

Del mismo modo que para el aceite esencial de limón se obtuvo el espectro de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) para analizar los picos característicos presentes en el ESP.

#### **4.2.2 Obtención y caracterización de las suspensiones filmógenicas con compuestos activos**

Se prepararon suspensiones formadoras de film (SFF) compuestas a base de almidón y quitosano en la proporción 75:25 (AM:Q), desarrollada en el Capítulo 3. Tal como se explicó anteriormente, esta proporción se seleccionó considerando las principales

propiedades relacionadas a su aplicación como envase, entre las cuales tienen relevancia las propiedades mecánicas y de barrera de los materiales, así como su capacidad de termosellado y costo.

La metodología para obtener las suspensiones filmogénicas fue similar a la descrita en el Capítulo 3. La solución de quitosano al 2.5% p/p se obtuvo disolviendo quitosano en polvo de MPM en una solución de ácido acético al 1.25% p/p. La misma se mantuvo en agitación durante 24 h para su completa disolución. Luego, esta solución fue filtrada en un tamiz (de 400  $\mu\text{m}$ ) para remover impurezas. Por otro lado, se preparó la suspensión gelatinizada de almidón de maíz (Glutal, Argentina) al 4% p/p. Se utilizó glicerol al 25% p/p de sólidos, como agente plastificante.

A las suspensiones filmogénicas se les agregaron los compuestos activos: extracto de semillas de pomelo (ESP) y aceite esencial de limón (AEL). Para favorecer la incorporación de los componentes, se estudió el agregado de dos emulsionantes de bajo peso molecular comercialmente disponibles: Tween 80 (T) y Span 80 (S) (Merk, EEUU). En algunas suspensiones se adicionó Tween 80 únicamente, mientras que en otras se utilizó una mezcla de los dos emulsionantes (ST), a una concentración de 0.1% p/p para las formulaciones con extracto de semillas de pomelo (Choi y col., 2002; Vargas y col., 2009), y concentraciones de 0.1 y 0.2% p/p para las formulaciones con aceite esencial de limón (Rao & McClements, 2012). Luego, se estudió la estabilidad de los sistemas con y sin el agregado de tensioactivos.

Para calcular la mezcla de emulsionantes óptima, se estableció el valor del balance lipofílico-hidrofílico (HLB, por sus siglas en inglés) necesario para obtener una emulsión estable, es decir, el HLB requerido por la fase oleosa del sistema (Orafidiya & Oladimeji, 2002), y se calculó la cantidad necesaria de cada tensioactivo en la formulación, mediante los valores de HLB de cada uno de ellos.

El HLB es una expresión empírica del balance hidrófilo-lipófilo de un tensioactivo de bajo peso molecular con características anfifílicas (Griffin, 1949), y éste valor tiene en cuenta el tamaño y fuerza de los grupos hidrofílicos y lipofílicos de la molécula. Un emulsionante o tensioactivo de carácter lipófilo tiene un HLB bajo (menor a 9), mientras que uno de carácter hidrófilo tiene un HLB alto (mayor a 11). Aquéllos que se encuentran entre 9 y 11, poseen carácter intermedio. Cuando dos o más emulsionantes se mezclan, el HLB final se calcula a partir de las proporciones de ambos componentes utilizados y los valores de HLB de cada uno de ellos. Para un determinado compuesto, este valor está relacionado con su



solubilidad. Un emulsionante con un HLB bajo, tiende a ser soluble en una fase oleosa, mientras que aquél que tiene un HLB alto, tiende a solubilizarse en agua (Hasenhuettl & Hartel, 2008). Cuando se busca que un sistema exhiba características acuosas, se debe escoger un emulsionante soluble en agua. A su vez, este método de clasificación permite predecir qué tipo de sistema coloidal favorecerá cada emulsionante (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Clasificación y uso de emulsionantes de acuerdo a su HLB.

Rango de HLB	Uso
4-6	Emulsionantes W/O
7-9	Agentes humectantes
8-18	Emulsionantes O/W
13-15	Detergentes
10-18	Solubilizadores

W/O: agua en aceite; O/W: aceite en agua

De esta manera, conociendo el HLB requerido para emulsiones de aceites esenciales en agua (HLB requerido = 12, según Orafidiya & Oladimeji, 2002), se determinó la cantidad de cada tensioactivo necesaria para el sistema de acuerdo a la Ecuación 4.1.

$$HLB_{Sistema} = x_{SPAN} \times HLB_{SPAN} + x_{TWEEN} \times HLB_{TWEEN} \quad (4.1)$$

Donde,  $x_{SPAN}$  y  $x_{TWEEN}$  son las fracciones másicas del Span 80 y Tween 80, respectivamente. A partir de esta ecuación la proporción de ambos emulsionantes a utilizar es: %Span80 = 28% y %Tween80 = 72%.

Así, los tensioactivos se incorporaron a las suspensiones filmogénicas (que constituyen la fase continua de las emulsiones obtenidas) y se realizó una mezcla en agitador magnético para dispersar los emulsionantes. Luego se incorporó el AEL o el ESP, en concentraciones del 1% y 3% p/p en la suspensión formadora de film (SFF). Las formulaciones se denominaron de la siguiente forma: AM:Q o control; ESP1, ESP3, AEL1 y AEL3.

El proceso de homogeneización se llevó a cabo en dos etapas: primero se realizó una pre-emulsificación de todos los componentes (durante 1 min a 13500 rpm), y luego, se realizó

una homogeneización primaria a 20500 rpm durante 45 s (Fig. 4.2) en el homogeneizador de tipo rotor-estator de alta velocidad (Ultraturrax T25, Janke y Kunkel, Alemania). Se trabajó bajo vacío, conectando el homogeneizador a un sistema Venturi, para impedir la formación de burbujas de aire (Fig. 4.3) que podrían ocasionar posteriormente defectos en las películas obtenidas.

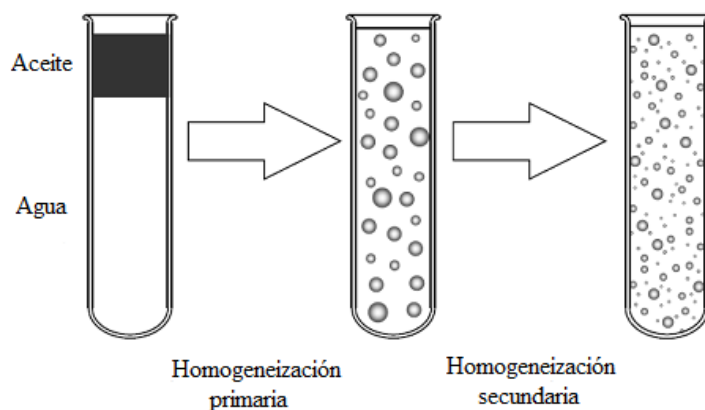


Figura 4.2: Obtención de emulsiones a través de dos etapas de homogeneización (primaria y secundaria).

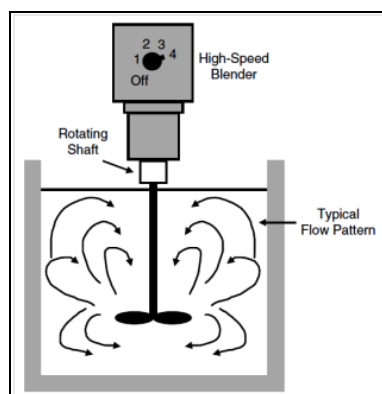


Figura 4.3: Esquema de homogeneizador de alta velocidad y sistema de vacío adaptado al Ultraturrax.

Las concentraciones de los componentes activos AEL y ESP fueron similares a aquellas utilizadas por otros autores para aceites esenciales solos o combinados con otros conservantes (Xu y col., 2007b; Viuda-Martos y col., 2008; Perdonés y col., 2012; Kanmani & Rhim, 2014; Teixeira y col., 2013). Igualmente, estas concentraciones son mayores que las concentraciones mínimas inhibitorias para AEL y ESP (Xu y col., 2007b)

determinadas en el Anexo I. La concentración máxima usada estuvo limitada considerando que la incorporación de aceite no provoque cambios sensoriales notables en el film, especialmente en su color y olor.

#### 4.2.2.1 Estudio de la estabilidad de las emulsiones

Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. La fase dispersa se encuentra en forma de gotas que presentan un tamaño de 0.1 a 20  $\mu\text{m}$  distribuidas en la fase continua, generalmente acuosa. La energía involucrada en el proceso de formación de la emulsión, se puede estimar considerando la energía libre interfacial de un sistema antes y después de la emulsificación u homogeneización (despreciando la entropía configuracional y considerando densidades similares, es decir, despreciando la separación gravitacional):

$$\Delta G_{\text{Formación}} = \gamma \times \Delta A \quad (4.2)$$

Donde,  $\Delta G_{\text{Formación}}$  es la energía libre asociada al proceso de formación de la emulsión,  $\gamma$  es la tensión interfacial (N/m) y  $\Delta A$  es el área interfacial creada.

Para que una emulsión resulte estable debe superarse una energía de activación  $\Delta G^*$ , para que el sistema alcance su estado termodinámicamente más favorable (Fig. 4.4)

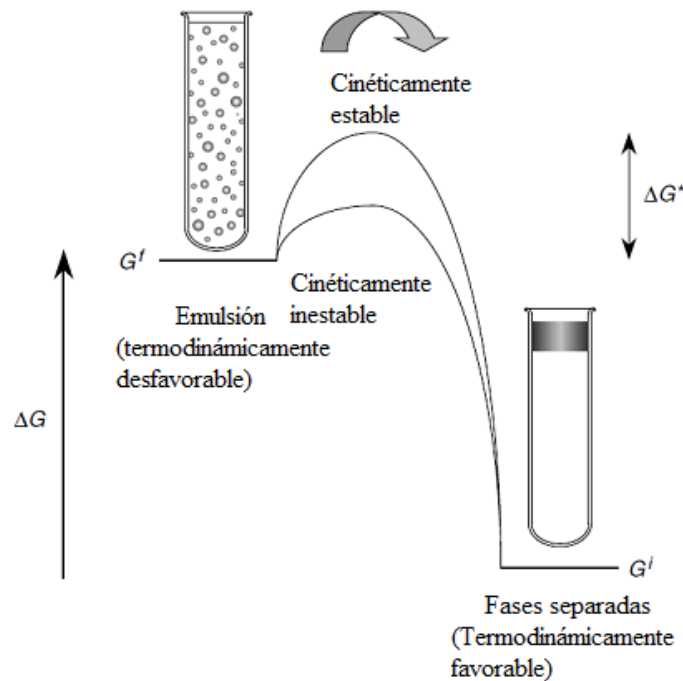


Figura 4.4: Esquema de una emulsión termodinámicamente inestable.

Las emulsiones pese a ser termodinámicamente inestables, pueden convertirse en cinéticamente estables mediante el uso de agentes tensioactivos que tienen la capacidad de

disminuir la tensión interfacial del sistema. Estos emulsionantes pueden ser básicamente de dos tipos: tensioactivos de bajo o de alto peso molecular, entre ellos se incluyen proteínas y polisacáridos con actividad superficial.

El proceso de desestabilización de las emulsiones puede ocurrir a través de cuatro mecanismos de inestabilidad (Fig. 4.5).

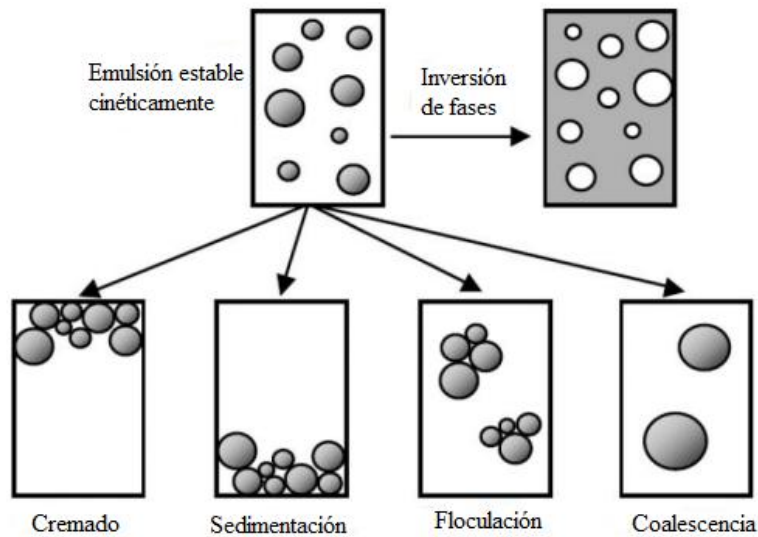


Figura 4.5: Procesos de desestabilización de emulsiones.

El cremado tiene un efecto adverso sobre la calidad de las emulsiones. Se produce por la diferencia de densidades del material disperso y la fase continua, por lo que existe una fuerza gravitacional neta que actúa sobre las gotas de la fase discontinua (en este caso, aceite). Este proceso de separación de fases está gobernado por la ley de Stokes:

$$F_g = -\frac{4}{3}\pi r^3(\rho_2 - \rho_1)g \quad (4.3)$$

Donde,  $r$  es el radio de las gotas;  $\rho_1$  es la densidad de la fase continua acuosa y  $\rho_2$  es la densidad de la fase discontinua;  $g$  es la aceleración de la gravedad.

A medida que las gotas se mueven hacia arriba experimentan una fuerza de fricción hidrodinámica que actúa en dirección opuesta y retardan su movimiento:

$$F_f = 6\pi\eta r v \quad (4.4)$$

Donde  $v$  es la velocidad de cremado y  $\eta$  es la viscosidad.

La gota alcanza una velocidad constante donde la fuerza de gravedad se equilibra con la fuerza de fricción. Combinando ambas ecuaciones, se obtiene la expresión de la velocidad de cremado, cuyo signo indicará si se está produciendo cremado o sedimentación:

$$v_{Stokes} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta} \quad (4.5)$$

El proceso de cremado es progresivo en el tiempo. Cuando las gotas alcanzan la parte superior, se compactan formando una crema cuyo espesor depende fundamentalmente de la concentración inicial, el tamaño y la polidispersidad de las gotas (Fig. 4.6).

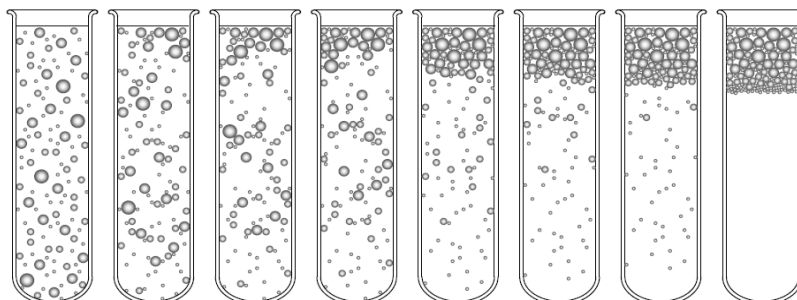


Figura 4.6: Evolución del cremado de una emulsión O/W.

La floculación es el proceso mediante el cual dos o más gotas se asocian entre sí manteniendo su integridad. En emulsiones diluidas, este proceso acelera el cremado, por lo que resulta indeseable. También puede producirse un aumento de la viscosidad de la emulsión y conducir a la formación de un gel. Asimismo, la coalescencia es el resultado de que el líquido dentro de dos o más gotas entre en contacto. Este proceso sólo puede ocurrir cuando las gotas están muy cerca y la película interfacial delgada que las separa se rompe.

#### 4.2.2.1.1 Ensayos de dispersión de luz

El método de dispersión de la luz se utiliza para evaluar la estabilidad de la emulsión al cremado. La emulsión se coloca en un tubo de vidrio vertical y un haz monocromático de luz en el infrarrojo cercano se hace incidir a través de él (Fig. 4.7). El equipo registra el porcentaje de luz retrodispersada (%BS, porcentaje de backscattering) y transmitida (%T) en función de la altura del tubo.

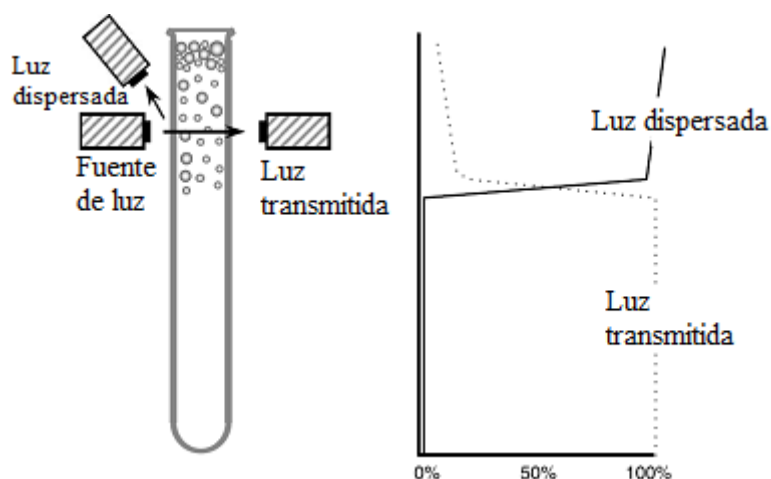


Figura 4.7: Esquema de funcionamiento del Turbiscan.

Para realizar el ensayo se colocaron las emulsiones conteniendo los componentes activos en los tubos de vidrio y se realizó el barrido en un equipo Turbiscan Classic (Formulation, Francia) a tiempo inicial, y luego cada 24 horas durante 7 días, para observar variaciones en los perfiles de backscattering. Durante el tiempo que duró el ensayo, las muestras se almacenaron en condiciones de refrigeración (4°C). Las mediciones se realizaron por duplicado a 25°C.

#### 4.2.2.1.2 Tamaño de gotas

La distribución de tamaños y el tamaño de las gotas de las SFFs se determinaron en un analizador de tamaño Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) en las emulsiones recién preparadas ( $t_0$ ) y luego de 7 días ( $t_7$ ) de almacenamiento refrigerado. Los resultados se expresaron como el diámetro medio superficial o diámetro de Sauter ( $D_{3,2}$ ) de las partículas, el cual representa una medida del área creada durante el proceso de homogeneización (Márquez y col., 2005). Por otra parte, la distribución del tamaño de las gotas se obtuvo graficando el volumen (%) en función del tamaño (nm). Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### 4.2.2.1.3 Tensión superficial

Se determinó la tensión superficial (mN/m) de las emulsiones mediante una adaptación del método de Du Noüy utilizando un anillo de platino de 1.863 cm de diámetro en un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro System, Inglaterra) (Fig. 4.8). Para llevar a cabo este método, se tuvieron en cuenta algunas consideraciones, tales como realizar la limpieza del anillo y del material de vidrio utilizados en el ensayo con solución sulfocrómica, luego

enjuagar con agua destilada y secar en estufa, para asegurarse de que se encuentren perfectamente limpios. También se verificó que el anillo se encuentre suspendido en forma perpendicular a la superficie de líquido.

La emulsión se colocó en un vaso de precipitados previamente lavado; se colocó el anillo en su posición inicial, esto es, sumergido bajo la superficie de la emulsión, y se elevó el anillo a una velocidad de 1 mm/s. Cuando el anillo se eleva, el líquido opone resistencia a dicho movimiento, siendo ésta proporcional a la tensión superficial del mismo.

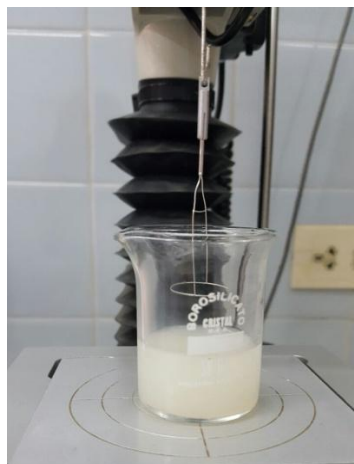


Figura 4.8: Determinación de la tensión superficial de una SFF con anillo de Du Noüy.

Se determinó la tensión superficial como la fuerza máxima aplicada en la longitud de la circunferencia del anillo, de acuerdo a la siguiente Ecuación:

$$\gamma = \frac{\Delta F}{2 \times L} = \frac{\Delta F}{2 \times 2\pi \times r} \quad (4.6)$$

Donde  $\Delta F$  es la fuerza máxima,  $L$  es la circunferencia y  $r$  el radio del anillo de platino. Las medidas se realizaron al menos por triplicado a 25°C.

#### 4.2.2.1.4 Observación microscópica

Las SFFs se observaron en un microscopio óptico (Leica Microsystems, Alemania) equipado con una cámara fotográfica, con una magnificación de 40X. Para ello, se colocó una gota de cada emulsión sobre un portaobjeto y se realizó la observación directamente en el microscopio.

#### 4.2.2.2 Caracterización reológica de las SFFs

El comportamiento reológico de las SFFs obtenidas por emulsificación se estudió mediante ensayos rotacionales en un reómetro Paar Physica Rheolab MC1 (Graz, Austria) utilizando

una geometría de cilindros concéntricos. Una vez colocadas las muestras (aproximadamente 40 mL) se dejaron reposar durante 5 minutos antes del ensayo. Se realizaron dos exploraciones: rampa ascendente de 0 a 500 s<sup>-1</sup> en 3 min; rampa descendente de 500 a 0 s<sup>-1</sup> en 3 min, separadas ambas exploraciones por 1 min a 500 s<sup>-1</sup>. Se obtuvieron las curvas de flujo de las emulsiones, graficando el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) en función de la velocidad de cizallamiento ( $\dot{\gamma}$ ). Para realizar el ajuste de los datos experimentales se utilizó el modelo de Ostwald de Waele:

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^n \quad (4.7)$$

Donde K es el índice de consistencia y n es el índice de comportamiento de flujo. Las muestras se analizaron al menos por duplicado a 25°C.

### 4.2.3 Obtención de las películas compuestas activas

Esta parte experimental del trabajo de Tesis se realizó en el marco de una beca de estadía corta (BecAr) desarrollada en el Instituto de Innovación en Alimentos (IIA), situado en la Ciudad Politécnica de la Innovación de la Universidad Politécnica de Valencia (Valencia, España).

Las películas se obtuvieron por el método de casting, al igual que en los capítulos previos. Para estos ensayos, las SFF se vertieron en placas de teflón de 15 cm de diámetro. El secado de las películas se realizó sobre una superficie nivelada durante 48 horas a 45% HR y 25°C, para reducir las pérdidas de compuestos activos volátiles durante esta etapa.

La Tabla 4.2 muestra la fracción en masa de los distintos componentes de las películas con respecto al contenido total de sólidos para cada formulación, junto con la cantidad total equivalente de sólidos vertidos en cada placa.



Tabla 4.2: Fracciones másicas (X) de los distintos componentes en las distintas formulaciones en relación al contenido total de sólidos y masa equivalente de sólidos (Se) vertidos por placa (g).

Muestra	X <sub>AM</sub>	X <sub>Q</sub>	X <sub>GLI</sub>	X <sub>ESP</sub>	X <sub>AEL</sub>	Se (g)
AM:Q	0.662	0.138	0.20	-	-	1.886
ESP1%	0.651	0.136	0.20	0.0163	-	1.897
ESP3%	0.631	0.131	0.19	0.0473	-	1.920
AEL1%	0.542	0.113	0.16	-	0.181	2.280
AEL3%	0.398	0.083	0.12	-	0.398	3.044

AM: almidón de maíz; Q: quitosano; GLI: glicerol; ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón.

Las películas se acondicionaron antes de realizar los ensayos durante una semana en un desecador a 25°C y 53% de HR usando una solución sobresaturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Panreac Química, SA, Castellar del Vallès, Barcelona).

#### 4.2.4 Caracterización de las películas activas compuestas

##### 4.2.4.1 Espesor, humedad y solubilidad

La humedad de las películas se determinó colocando las muestras en una estufa de convección natural a 60°C durante 24 horas y luego en una estufa de vacío a 60°C durante 24 horas, lo que permitió alcanzar el peso constante de las muestras. El contenido de humedad (%) se calculó por diferencia de peso; las determinaciones se realizaron por triplicado.

El espesor de los films fue medido con un micrómetro digital Palmer (Palmer-Comecta, España) con una aproximación de 1 µm en al menos seis posiciones al azar.

La solubilidad de las películas se determinó colocando una muestra de film de 2 cm<sup>2</sup> en agua bidestilada, en una relación película:agua de 1:100 p/p, durante 72 horas a 25°C. Transcurrido dicho tiempo, los restos de película fueron transferidos a una estufa de convección (J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España) durante 24 horas a 60°C para remover el agua y luego a una estufa con vacío durante 24 horas a 60°C. Finalmente, la solubilidad se calculó como la diferencia entre el peso seco inicial y final divididos por el peso seco

inicial y fue expresado como porcentaje. Cada formulación se realizó al menos por triplicado.

#### 4.2.4.2 Retención del aceite esencial en las películas conteniendo AEL

La misma metodología utilizada para determinar el contenido de limoneno presente en el aceite esencial de limón, se empleó para analizar la cantidad de aceite esencial que queda retenida en las películas luego del secado. En este caso, se realizó una extracción de los componentes retenidos en la película con éter dietílico (Panreac Química, SA, Castellar del Vallès, Barcelona). A tal fin, se puso en contacto 0.3 gramos de film con 10 mL del solvente mencionado, durante 24 horas. Luego, con una microjeringa se inyectaron 2  $\mu$ L en el cromatógrafo gaseoso con detector FID, trabajando bajo las condiciones descriptas previamente. Como resultado, se obtuvieron los cromatogramas, y mediante integración se obtuvo el área bajo el pico correspondiente al tiempo de retención del limoneno, que es el componente mayoritario del AEL. Ingresando con este dato en la recta de calibración obtenida anteriormente, se calculó la concentración de limoneno presente en el film en ppm. La determinación se realizó al menos por duplicado.

#### 4.2.4.3 Desarrollo de color superficial

Se determinó el espectro de reflectancia de la superficie de las películas entre 400 y 700 nm usando un espectrocolorímetro CM-3600d (Minolta Co., Tokio, Japón) sobre un fondo blanco y un fondo negro. Se aplicó la teoría de Kubelka-Munk para dispersión múltiple para determinar la transparencia de las películas. La transmitancia interna ( $T_i$ ) se calculó de acuerdo a la ecuación (4.8). Los parámetros  $a$  y  $b$  se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (4.9) y (4.10).

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (4.8)$$

$$a = \frac{1}{2} \left( R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (4.9)$$

$$b = \sqrt{b^2 - 1} \quad (4.10)$$

Donde  $R_0$  es la reflectancia de la muestra sobre un fondo negro ideal;  $R$  es la reflectancia de la película colocada sobre un fondo con reflectancia conocida,  $R_g$ . Las mediciones se realizaron al menos por triplicado.

Los parámetros de color CIE  $L^*a^*b^*$  fueron obtenidos de los datos calculados de la reflectancia infinita considerando un observador a  $10^\circ$  y un iluminante de referencia D65 de acuerdo con Ortega-Toro y col. (2015).

El brillo de la superficie de las películas fue medido en un equipo Multigloss 268 (Konica Minolta, Alemania) y los resultados fueron expresados a  $60^\circ$  de la luz de incidencia de acuerdo al método estándar ASTM D523 (ASTM 1999). Las mediciones se realizaron al menos por triplicado.

### **4.2.4.4 Propiedades de barrera**

#### **4.2.4.4.1 Permeabilidad al $O_2$**

La permeabilidad de las películas al oxígeno fue determinada en un equipo Mocon OX-TRAN modelo 2/21 ML (Lippke, Neuwied, Alemania). El ensayo se realizó a  $25^\circ\text{C}$  y 53% HR; el área expuesta de las muestras fue  $50\text{ cm}^2$ . Las muestras fueron acondicionadas en las celdas durante 6 horas, y luego se tomaron los valores de transmisión de  $O_2$  cada 20 min hasta que se alcanzó el equilibrio. Para obtener la permeabilidad al oxígeno se consideró el espesor de las películas, y los resultados se expresaron en  $\text{cm}^3\text{ s}^{-1}\text{ m}^{-1}\text{ Pa}^{-1}$ . Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **4.2.4.4.2 Permeabilidad al vapor de agua**

La permeabilidad al vapor de agua de las muestras fue determinada usando el método gravimétrico ASTM E96-95 (ASTM, 1995), teniendo en cuenta la modificación propuesta por McHugh y col. (1993). Las películas se colocaron en celdas de permeación Payne (3.5 cm de diámetro y  $9.62\text{ cm}^2$  de área, Elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica), las cuales fueron llenadas previamente con agua destilada para asegurar una humedad relativa de 100% en uno de los lados de la película. Luego, las copas se colocaron en desecadores con una solución sobresaturada de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Panreac Química, SA, Castellar del Vallès, Barcelona) para obtener 53% de humedad relativa a  $25^\circ\text{C}$ . Los desecadores fueron provistos con un ventilador de velocidad variable para asegurar una alta fuerza de impulsión a través del film y favorecer la difusión del vapor de agua. Luego de alcanzarse la condición de estado estacionario, las celdas fueron pesadas ( $0.0001\text{g}$ ) a intervalos de 1 hora durante 8 horas. La velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) se calculó como la pendiente de la recta de ajuste de los datos de pérdida de peso en función del tiempo.

La presión de vapor en la superficie interior de la película ( $p_2$ ) fue obtenida con la Ec. (4.11), propuesta por McHugh y col. (1993), para corregir el efecto de los gradientes de concentración en el aire del espacio de cabeza de las copas:

$$VTVA = \frac{PDL_n \left[ \frac{p - p_2}{p - p_1} \right]}{RT\Delta z} \quad (4.11)$$

Donde P es la presión total; D es la difusividad de agua a través del aire a 25°C; R es la constante de la ley de los gases; T es la temperatura absoluta;  $\Delta z$  es la altura promedio del aire estanco en el espacio de cabeza;  $p_1$  es la presión de vapor de agua en la superficie de la solución y  $p_2$  es la presión de vapor corregida en la superficie interior del film. La permeancia del vapor de agua fue calculada de acuerdo a la Ec. (4.12):

$$Permeancia = \frac{VTVA}{p_2 - p_3} \quad (4.12)$$

Donde  $p_3$  es la presión en la superficie exterior de la película en el desecador. Finalmente, la permeabilidad al vapor de agua se obtuvo como la permeancia multiplicada por el espesor de la película. El ensayo fue realizado por cuadruplicado.

#### 4.2.4.5 Propiedades mecánicas

El comportamiento mecánico a la tracción de las películas se analizó mediante un texturómetro TA.XT plus model, (Stable Micro Systems, Inglaterra) con un sistema de mordazas de tensión A/TG. De las películas acondicionadas se cortaron probetas de 2.5 cm de ancho y 10 cm de largo, se montaron en las mordazas y se traccionaron hasta su ruptura a una velocidad de ensayo de 50 mm/min. Se obtuvieron las curvas de esfuerzo-deformación y a partir de las mismas se calculó el esfuerzo tensil (TS), el módulo elástico (EM) y la elongación a la ruptura (EB), de acuerdo al método estándar ASTM D882 (ASTM, 2011). El ensayo fue realizado a 25°C y 53% HR, analizando al menos 8 muestras de cada formulación.

#### 4.2.4.6 Análisis térmico

##### 4.2.4.6.1 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que permite estudiar las propiedades térmicas y las transiciones de fase de un material polimérico. En el horno del equipo se colocan dos cápsulas, una con la muestra y otra con una referencia; y se registra el flujo de

calor necesario para mantener la misma temperatura en las dos cápsulas. A partir del termograma obtenido se pueden extraer algunos datos relevantes: temperatura de pico, temperatura inicial de la transición, temperatura final de la transición y energía involucrada en la transición, la cual está representada por el área bajo la curva. Este estudio permite obtener las temperaturas de transición vítrea de los polímeros.

El análisis de calorimetría diferencial de barrido fue realizado en un DSC 1 Stare System (Mettler-Toledo, Inc., Suiza). Las muestras (10 mg de película aprox.) se colocaron en cápsulas de aluminio y luego se sellaron; se utilizó como referencia una cápsula vacía. El equipo registró el flujo de calor en función de la temperatura. Las cápsulas fueron calentadas desde 0°C hasta 200°C a una velocidad de 10°C/min, etapa en la cual el agua libre fue eliminada de las películas y se borró la historia térmica previa del material. Luego, en una segunda etapa las muestras fueron enfriadas hasta 0°C y finalmente calentadas hasta 200°C a la misma velocidad de calentamiento. Se determinó la temperatura de transición vítrea como el punto de inflexión medio donde se produce el cambio de pendiente de la curva. Se analizaron al menos dos muestras de cada formulación.

#### **4.2.4.6.2 Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico permite estudiar la estabilidad térmica de los materiales y conocer su potencial aplicación industrial, en casos en que éstos sean sometidos a tratamientos con calor durante su procesamiento (Villetti y col., 2002). Mediante este estudio se evalúa la pérdida de masa de la muestra sometida a temperatura en una atmósfera controlada. Como resultado se obtiene una curva de descomposición térmica (pérdida de masa, %, en función de la temperatura).

El análisis fue realizado en una termobalanza TGA 1 Stare System (Mettler-Toledo, Inc., Suiza). Las muestras acondicionadas fueron calentadas desde 25°C hasta 600°C a una velocidad de 10°C/min, usando un flujo de nitrógeno de 250 mL/min. El equipo registró la pérdida de peso (TG) y su derivada (DTG); se determinó la temperatura de degradación térmica ( $T_{\text{pico}}$ ) como el máximo de las curvas de DTG. Se analizaron al menos 2 replicados por cada formulación.

#### **4.2.4.7 Análisis microestructural**

##### **4.2.4.7.1 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros FTIR de las películas se obtuvo con el espectrofotómetro IR (Bruker, Karlsruhe, Alemania) equipado con una celda óptica de platino y con un detector RT-Dia TGS, utilizando el modo de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) como se describió previamente. Se obtuvieron los espectros desde 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  y se realizaron 64 escaneos a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Los datos fueron analizados utilizando el software OPUS (Bruker, Karlsruhe, Alemania). Los espectros se procesaron como se mencionó anteriormente.

##### **4.2.4.7.2 Microscopía electrónica de barrido SEM**

La homogeneidad de las películas, la topografía de las superficies, la microestructura de las secciones transversales del material y su espesor, se evaluaron por SEM. A tal fin se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300 (Japón). Previo al análisis, las muestras se colocaron en desecadores con  $\text{P}_2\text{O}_5$  (Panreac Química, SA, Castellar del Vallès, Barcelona) para eliminar la humedad que podría interferir en las observaciones; luego se congelaron con nitrógeno líquido y se criofracturaron para poder observar tanto las secciones transversales como la superficie de las películas. Las muestras se montaron en soportes de bronce y se recubrieron con una fina capa de oro de 40-50 nm en una atmósfera de argón. Este recubrimiento metalizado tiene como finalidad hacer más conductora la superficie de la muestra, eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica. Para todas las observaciones se utilizó un voltaje de aceleración de 10 kV.

#### **4.2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante**

La actividad antioxidante de los compuestos activos y de las películas se evaluó determinando la capacidad antioxidante equivalente del Trolox (TEAC), utilizando el método descrito por Re y col. (1999). El objetivo de este método es comparar la actividad antioxidante de la sustancia analizada con la actividad antioxidante de un estándar, Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E. De acuerdo con este método, se disolvió el reactivo ABTS (ácido) en agua para obtener una solución 7 mM, al cual se permitió reaccionar con una solución de persulfato de potasio 2.45 mM durante 16 horas en la oscuridad. El catión radical de ABTS ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ) obtenido, se diluyó en una solución de agua-metanol (2:8) hasta obtener una absorbancia inicial de

0.70 ( $\pm 0.02$ ) a 734 nm. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730 (Estados Unidos), utilizando como blanco una solución agua-metanol (2:8). Las soluciones se obtuvieron disolviendo las películas (180 mg) en 10 mL de la mezcla de agua-metanol mencionada para favorecer la extracción de los componentes antioxidantes (Jiménez y col., 2013). Se prepararon soluciones de AEL y ESP de diferentes concentraciones en el mismo solvente y se analizó su capacidad de reducción de absorbancia. 10  $\mu$ L de la solución a ensayar fueron incorporados a 990  $\mu$ L de la solución del radical ABTS y transcurridos 6 min se registró el porcentaje de reducción de absorbancia. Para la calibración se prepararon soluciones estándares de Trolox de diferentes concentraciones (0 a 200 mg/L) y se siguió el mismo procedimiento. Los resultados fueron obtenidos a partir de las curvas de calibración y se expresaron como la concentración necesaria para producir la misma reducción de absorbancia que una solución 1 mM de Trolox. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### **4.2.6 Estudio de la capacidad antimicrobiana**

Se determinó la capacidad antimicrobiana de las películas de acuerdo con el método descrito por Tepe y col. (2005) con algunas modificaciones relacionadas con la concentración de los microorganismos y el diámetro de los discos de muestras utilizados. Los microorganismos elegidos para el ensayo fueron algunos mohos (*Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*) y algunas bacterias Gram+ y Gram- (*Listeria innocua* y *Escherichia coli*). Los mohos seleccionados están relacionados con el deterioro de frutas mientras que las bacterias escogidas están relacionadas con alteraciones de alimentos o son responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. Todos los microorganismos fueron obtenidos de la colección española de cultivos tipo (Burjassot, Valencia, España). Los mohos se mantuvieron en congelación en Agar papa dextrosa (PDA) y las bacterias en caldo tripteína soja (TSB), suplementados con 30% de glicerol como agente crioprotector.

Las esporas de los hongos fueron contadas en una cámara Thoma Neubauer y diluidas en caldo papa dextrosa (PDB) hasta obtener una concentración de  $10^5$  esporas/mL. Por otra parte, los cultivos de bacterias fueron diluidos en TSB hasta  $10^5$  UFC/mL. La suspensión de esporas de mohos y de bacterias fueron inoculadas (100  $\mu$ L) en placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa y agar tripteína soja respectivamente, y luego extendidos con una espátula de Drigalski.

Las muestras de películas fueron cortadas en círculos de 2 cm de diámetro y colocadas en las placas inoculadas. Al mismo tiempo, se impregnaron papeles de filtro estériles del mismo diámetro con los componentes ESP y AEL puros, a la misma concentración que se encontraba en las películas de menor concentración, y se colocaron sobre el agar. Todas las placas se incubaron durante 48 horas a 25°C para mohos y 24 horas a 37°C para bacterias. Luego de transcurridos dichos tiempos, se determinó el diámetro de la zona de inhibición. El ensayo se realizó al menos por triplicado.

### **4.2.7 Análisis estadístico**

Todos los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el software Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD) a través del análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon mediante el test de la diferencia mínima de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%. La relación entre las propiedades fisicoquímicas, de barrera, mecánicas y ópticas se estudió mediante el análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software InfoStat (versión 2008, Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## **4.3 Resultados y Discusión**

### **4.3.1 Caracterización de los componentes activos**

#### **4.3.1.1 Caracterización del aceite esencial de limón**

Según la literatura, el componente principal del aceite esencial de limón es  $\alpha$ -limoneno, seguido de  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -terpinoleno, terpinen-4-ol, cimeno y, en una menor proporción,  $\epsilon$ -citralina (Moufida & Marzouk, 2003; Perdonés, 2016; AL-Jabri & Hossain, 2014, 2018). Sin embargo, el contenido de limoneno varía de acuerdo a la fuente y el procedimiento de extracción.

En la Fig. 4.9, se presenta la curva de la calibración obtenida a partir de los cromatogramas del reactivo patrón Limoneno.



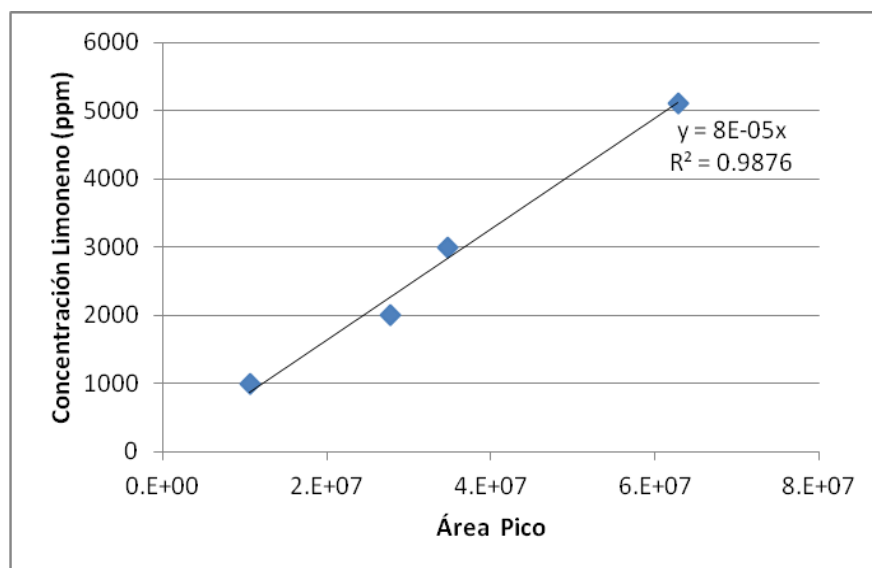


Figura 4.9: Recta de calibración de Limoneno.

Por otra parte, en la Fig. 4.10 se muestra el cromatograma del aceite esencial de limón utilizado en el presente trabajo de Tesis. Como puede observarse en el cromatograma, se encontraron alrededor de 41 componentes diferentes en el aceite. Entre ellos, los más relevantes son los siguientes:  **$\alpha$ -pineno**, campeno, sabineno,  **$\beta$ -pineno**,  $\beta$ -mirceno, octanal,  $\alpha$ -terpineno, **limoneno**,  $\beta$ -(Z)-ocimeno (Z),  $\beta$ -(E)-ocimeno,  $\gamma$ -terpineno, hidrato de (Z)-sabineno,  $\alpha$ -terpinoleno, linalol, hidrato de (E)-sabineno, nonanal, citronelal,  $\alpha$ -terpineol, decanal, neral, geranial, undecanal, cariofileno,  $\beta$ -(Z)-farneseno,  $\beta$ -(E)-farneseno, germacreno D,  $\beta$ -bisaboleno (New Directions Aromatics). Entre los cuales se destacan por su contenido en el aceite, tres compuestos:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y limoneno.

A partir del cromatograma del limoneno se determinó que el tiempo de retención del pico cromatográfico fue de 16 min, y a partir del cromatograma del AEL se identificó este componente (Fig. 4.10). Asimismo por integración del área del pico y considerando el volumen de dilución y la masa de la muestra, se calculó el contenido de limoneno en el aceite esencial de limón (g limoneno / 100 g AEL) de acuerdo a la ecuación 4.12.

$$\text{Contenido de limoneno} = \frac{A \times a \times V}{1 \times 10^6 \times P_m} \quad (4.12)$$

Donde,  $A$  es el área bajo el pico;  $a$  es la pendiente de la recta de calibración;  $V$  es el volumen de la dilución (mL);  $P_m$  es el peso de la muestra (mg). Finalmente, se obtuvo que el contenido de limoneno en el AEL es 66%. Andreatta y col. (2008) obtuvieron valores

similares (68.68%) de contenido de limoneno en aceite esencial de limón extraído mediante hidrodestilación a presión atmosférica a partir de la cáscara.

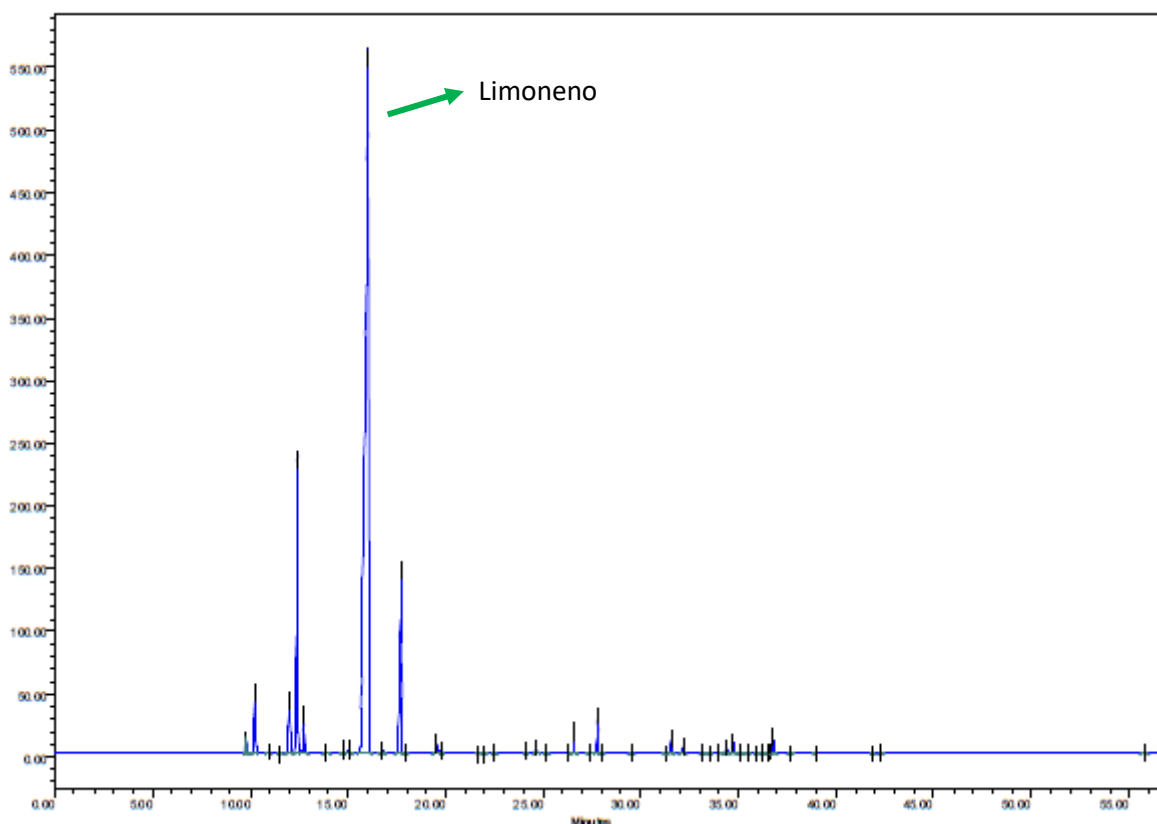


Figura 4.10: Cromatograma de aceite esencial de limón.

Como parte de la caracterización del aceite esencial también se obtuvo el espectro de infrarrojo (Fig. 4.11). Se observa en el espectro la presencia de un pico principal de absorción a  $890\text{ cm}^{-1}$  relacionado con el estiramiento C-H que es característico de los compuestos aromáticos (Sánchez Aldana y col., 2014), en donde se destaca la presencia de  $\beta$ -pineno (López Muñoz, 2011). Asimismo, se observa la banda asimétrica intensa localizada alrededor de  $3100\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ , que indica la presencia de hidrocarburos alifáticos e insaturados relacionados con los componentes terpenoides. En la sección 4.3.5.7 se hará una discusión más detallada del espectro.

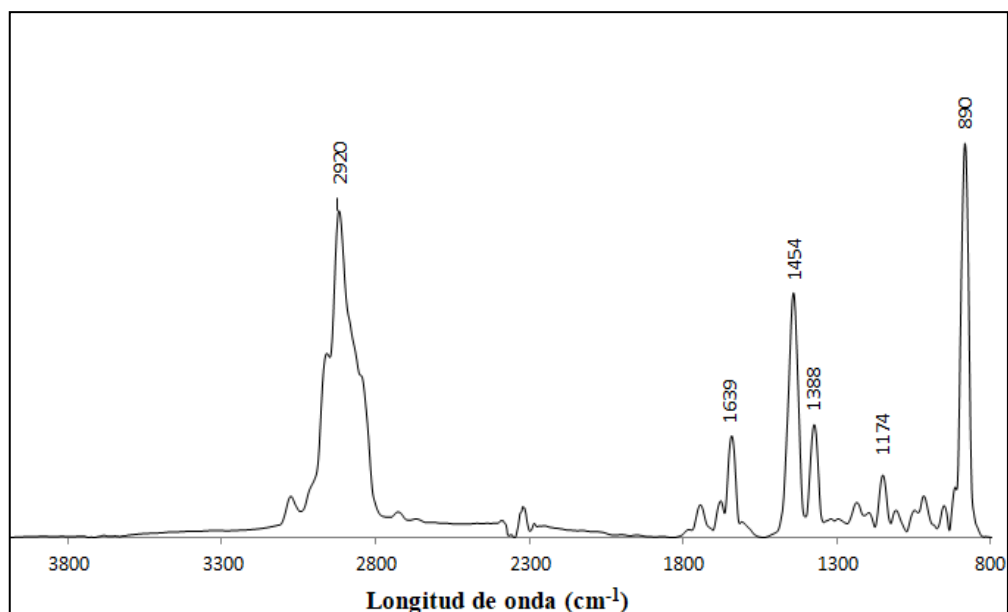


Figura 4.11: Espectro FTIR-ATR de aceite esencial de limón.

#### 4.3.1.2 Caracterización del extracto de semillas de pomelo

Mediante liofilización se eliminó el disolvente del extracto y se pudo determinar el contenido de sólidos del ESP, obteniéndose  $7.52 \pm 0.02\%$  de sólidos.

En la Fig. 4.12 se muestra el cromatograma obtenido a 330 nm; en relación a los patrones disponibles, se identificaron los siguientes compuestos presentes, mayoritariamente flavonoides: quercetina ( $tr = 17.85\text{min}$ ), rutina ( $tr = 16.8\text{min}$ ), ácido clorogénico ( $tr = 11.87$ ) y una banda localizada a los 13.3min a la que contribuyen los ácidos siríngico ( $tr = 13.83$  min), vanílico ( $tr = 13.52$  min) y caféico ( $tr = 13.11$  min). Además, se identificó la presencia de ácido gálico ( $tr = 8.3\text{min}$ ). Los picos que aparecen a los mayores tiempos de retención y que presentan un área importante no pudieron ser identificados.

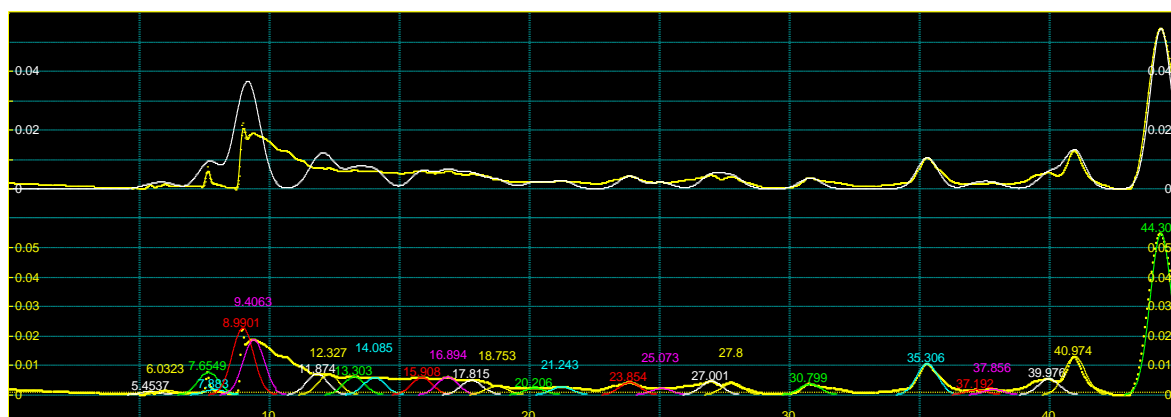


Figura 4.12: Cromatograma de extracto de semillas de pomelo obtenido por HPLC a 330nm así como la deconvolución de los picos presentes y los tiempos de retención asignados.

Asimismo, el espectro de infrarrojos de ESP con los picos característicos puede observarse en la Figura 4.13.

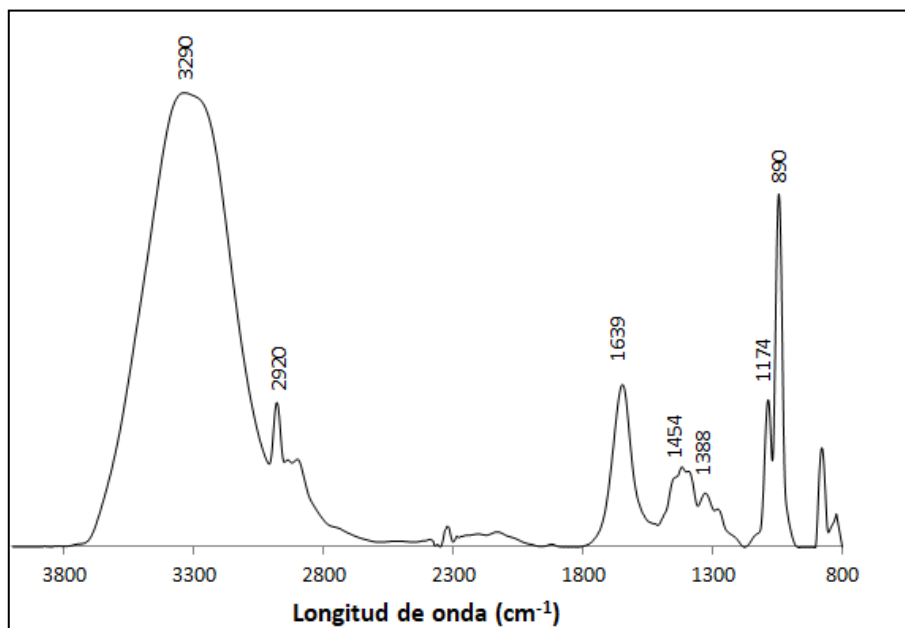


Figura 4.13: Espectro FTIR-ATR de extracto de semillas de pomelo.

Los espectros FTIR-ATR de ESP exhiben una banda de absorción amplia a 3600-3100  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada con las vibraciones -OH típicas de compuestos aromáticos/fenólicos (Boumail y col., 2013), revelando el carácter hidrófilo de este compuesto activo. Además, el pico a 890  $\text{cm}^{-1}$  descrito previamente también se observa en espectros de ESP. El espectro muestra también una banda importante a 1639  $\text{cm}^{-1}$ , señal característica del estiramiento del grupo C=O, a la que contribuyen, entre otros, los flavonoides presentes en el extracto. En la sección 4.3.5.7 se hará una discusión más detallada del espectro.

### 4.3.2 Estudio de la estabilidad de las SFFs obtenidas por emulsificación

#### 4.3.2.1 Tensión superficial y tamaño de gota

En la Tabla 4.3, se presentan los resultados de las medidas de tensión superficial obtenidos para las distintas formulaciones. Como puede observarse, las SFFs sin tensioactivos (ESP y AEL) presentaron valores de tensión superficial mayores que las formulaciones que contenían este tipo de compuestos. Estos resultados indicarían que la incorporación de tensioactivos mejoraría la estabilidad del sistema.

Tabla 4.3: Diámetro medio superficial  $D_{3,2}$  y tensión superficial para formulaciones con y sin agregado de tensioactivos.

Formulación	$D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )		Tensión superficial mN/m
	Día 0	Día 7	
ESP	$0.221 \pm 0.008^f$	$0.224 \pm 0.012^c$	$70.60 \pm 1.42^a$
ESP 0.1T	$1.969 \pm 0.006^a$	NA	$54.21 \pm 1.48^c$
ESP 0.1ST	$1.469 \pm 0.004^b$	$0.237 \pm 0.001^c$	$49.64 \pm 0.71^d$
AEL	$0.231 \pm 0.001^f$	$0.228 \pm 0.004^c$	$63.94 \pm 0.77^b$
AEL 0.1T	$0.533 \pm 0.011^e$	$0.533 \pm 0.011^a$	-
AEL 0.1ST	$0.612 \pm 0.016^c$	$0.459 \pm 0.014^b$	-
AEL 0.2T	$0.575 \pm 0.02^d$	NA	$49.09 \pm 1.48^d$
AEL 0.2ST	$0.516 \pm 0.005^e$	NA	$47.04 \pm 0.01^d$

Se indica el valor medio  $\pm$  desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón; T: Tween 80; ST: Span 80 + Tween 80. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). NA: no aplica.

Asimismo, puede observarse que la reducción de la tensión superficial fue más evidente cuanto mayor fue la concentración de Tween 80 y Span 80.

En la Tabla 4.3 también se presentan los resultados del diámetro medio superficial  $D_{3,2}$ . En algunas muestras no se determinó el tamaño a los 7 días porque ya era evidente la separación de fases.

Previo a las determinaciones de tamaño de gotas, se determinó el pH de las SFFs (pH = 5.02), y se ajustó el pH del agua de dilución utilizada en el equipo a este mismo valor, con el objetivo de evaluar el efecto de este parámetro en las mediciones. Como resultado, no se observó influencia del pH; por lo tanto, no sería necesario realizar el ajuste del pH del agua en las determinaciones de tamaño de partícula.

Con respecto a la distribución del tamaño de gotas, se observó que todas las SFFs presentaron distribución bimodal. A modo representativo, en la Fig. 4.14 se observa la curva obtenida para AEL.

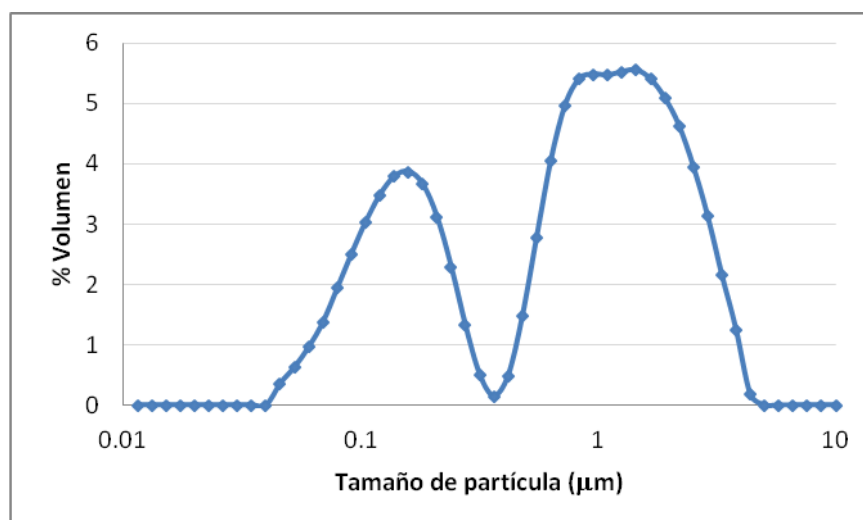


Figura 4.14: Distribución del tamaño de partículas de suspensión formadora de film con 3% de AEL y sin tensioactivos.

A través de las observaciones microscópicas, se pudo determinar que el ESP se incorporó en forma adecuada a la matriz, ya que no se formaron gotas en una segunda fase. Como era de esperar este resultado se atribuye al mayor carácter hidrofílico del ESP y a su mayor compatibilidad con las SFFs. En cambio, en las SFFs con AEL se observaron las gotas de tamaño micrométrico de la fase oleosa dispersas en la fase continua, indicando la formación de la emulsión; se evidencia además la gran dispersión de tamaños de gota presentes en la emulsión. En las formulaciones con aceite esencial de limón y 0.2% de tensioactivos se observaron gran cantidad de flóculos. En la Figura 4.15 se muestran dos de las SFFs, una correspondiente a la suspensión con agregado de 3% de ESP y la otra con la misma concentración de AEL. Como se mencionó anteriormente, en la SFF conteniendo ESP se observa una matriz homogénea, mientras que en la que se incorporó AEL se pueden detectar las gotas de la fase dispersa.

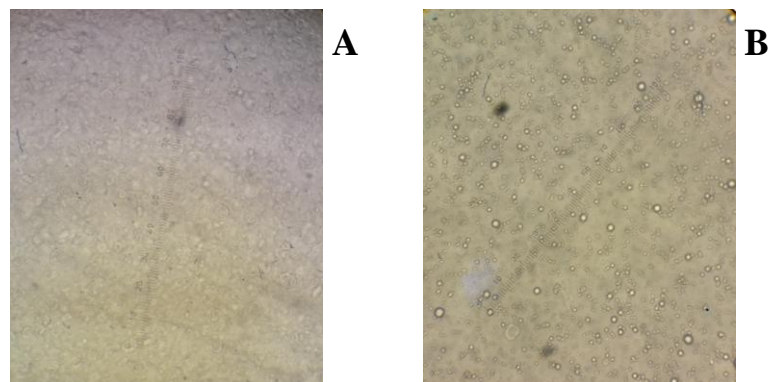


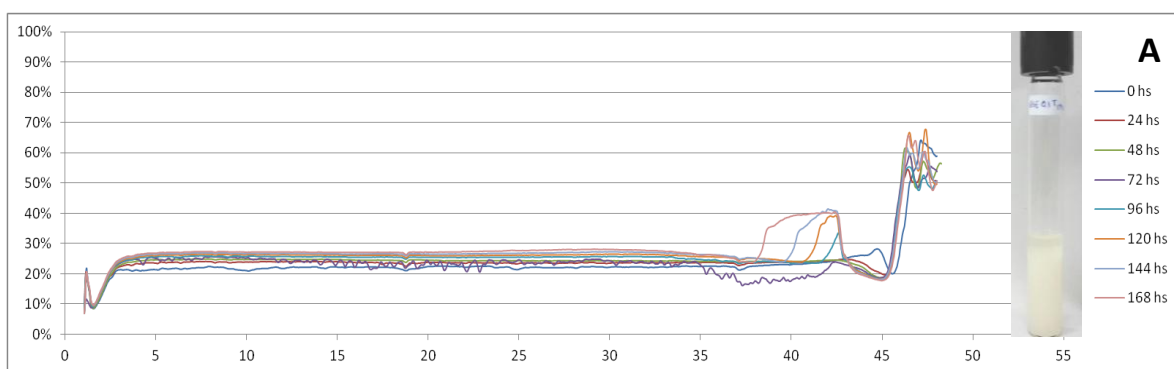
Figura 4.15: Suspensiones formadoras de film (SFFs) conteniendo: A) 3% de extracto de semillas de pomelo, ESP; y B) 3% de aceite esencial de limón, AEL.

#### 4.3.2.2 Dispersión de luz

En la Fig. 4.16 se encuentran los perfiles de Backscattering (BS) en función de la altura del tubo (mm) para las SFFs formuladas con ESP.

Para analizar los fenómenos de desestabilización, los perfiles se dividieron en 3 zonas de estudio: zona inferior del tubo (zona I: de 2 a 5 mm), zona media (zona II: de 5 a 38 mm), y zona superior (zona III: a partir de 38 mm).

Para las suspensiones con ESP, en la zona media del tubo se observó un ligero aumento del BS a lo largo del tiempo. Mientras que en la zona superior del tubo se puede observar un corrimiento de los perfiles debido a una separación de fases que se manifiesta a las 72 h, siendo más pronunciado este efecto para la SFF con agregado de 0.1% de Tween 80.



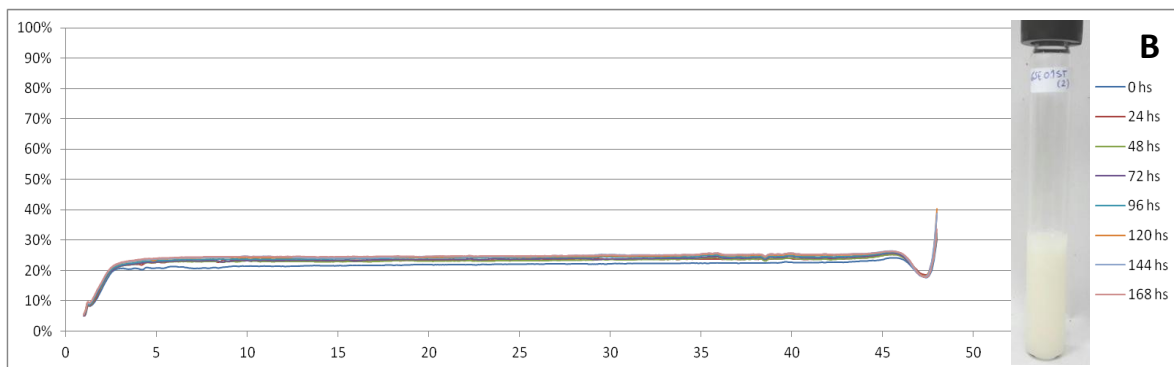


Figura 4.16: Perfiles de  $\Delta BS$  vs altura del tubo (mm) obtenidos con Turbiscan durante 7 días para SFFs con extracto de semillas de pomelo y emulsionantes. A: ESP 0.1T; B: ESP 0.1ST (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80).

También se analizó la cinética de inestabilidad, calculando la variación de Backscattering ( $\Delta BS$ , con respecto al valor inicial) en función del tiempo para cada formulación. En la Fig. 4.17 se puede observar el aumento del BS en función del tiempo para las muestras con emulsionantes, lo que indica mayor inestabilidad al incorporar los tensioactivos. Estos resultados podrían deberse a que el extracto de semillas de pomelo consiste en una matriz hidroalcohólica que se incorpora adecuadamente a la mezcla de polímeros, no requiriendo el agregado de emulsionantes.

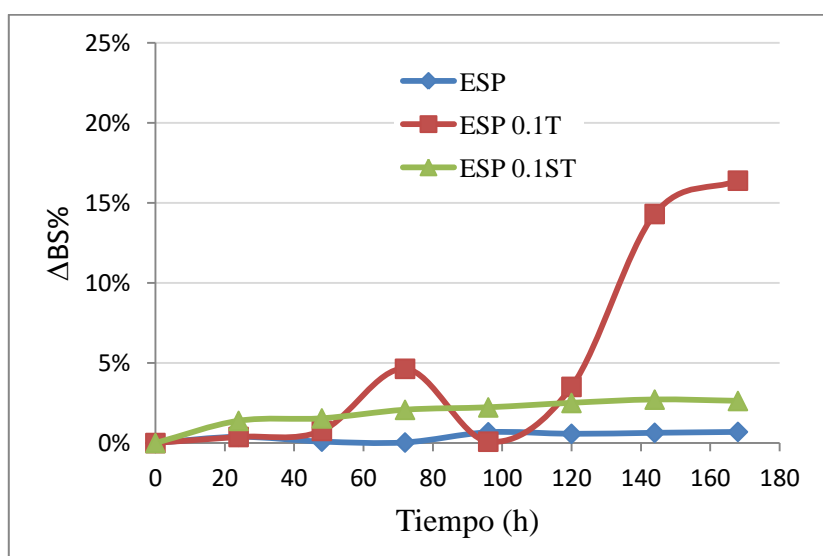
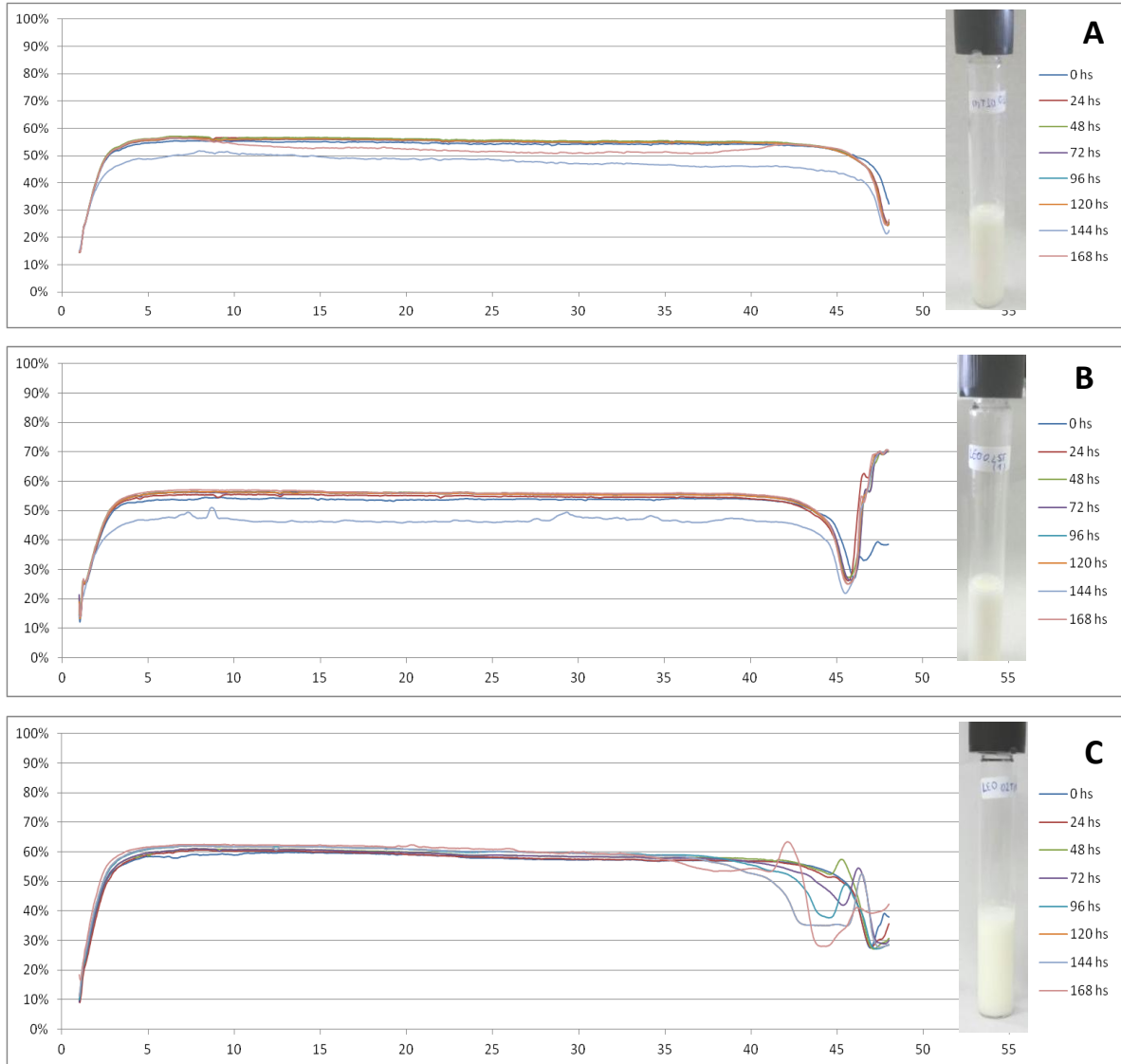


Figura 4.17: Variación del Backscattering ( $\Delta BS$ , %) en función del tiempo de almacenamiento para SFFs con extracto de semillas de pomelo sin tensioactivos y con 0.1% de tensioactivos (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80).



En la Figura 4.18, se muestran los perfiles de BS vs altura del tubo para las emulsiones con AEL. Se puede observar un aumento de la fase cremada (zona III) a lo largo del tiempo para las muestras con mayor concentración de emulsionantes (0.2%), lo cual indica menor estabilidad para estas emulsiones.



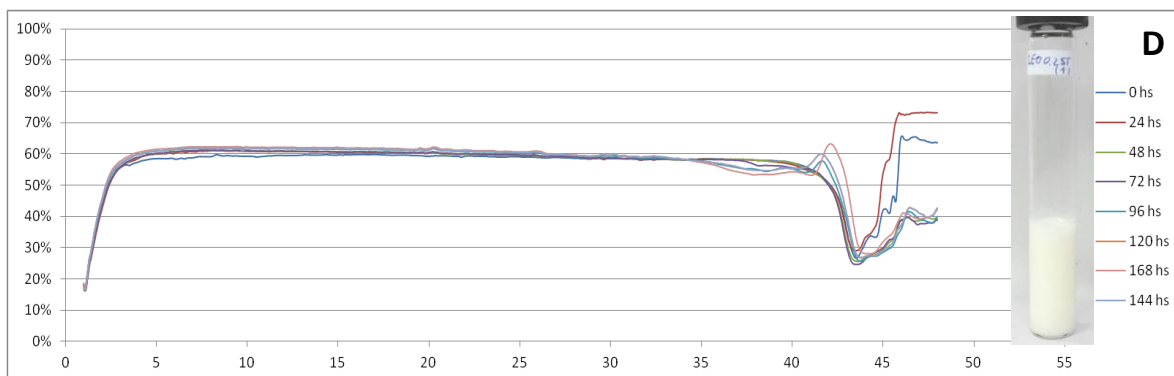


Figura 4.18: Perfiles de Delta de Backscattering ( $\Delta BS$ ) en función de la altura del tubo obtenidos con Turbiscan durante 7 d para emulsiones con aceite esencial de limón. A: AEL 0.1T; B: AEL 0.1ST; C: AEL 0.2T; D: AEL 0.2ST (T: Tween80; ST: mezcla de Span80 y Tween80).

Esta inestabilidad observada en los perfiles de Backscattering se corresponde con lo obtenido en la curva de cinética de inestabilidad,  $\Delta BS$  vs tiempo (Figura 4.19). En ésta se aprecia que al aumentar la concentración de tensioactivos aumenta  $\% \Delta BS$ , lo que indica mayor inestabilidad con respecto a la suspensión sin tensioactivos. Si bien, se hubiera esperado *a priori* que las SFFs con tensioactivos fueran más estables, resultados similares en cuanto a la estabilidad de sistemas conteniendo quitosano y aceite esencial de limón fueron encontrados por Hernández Jiménez (2014).

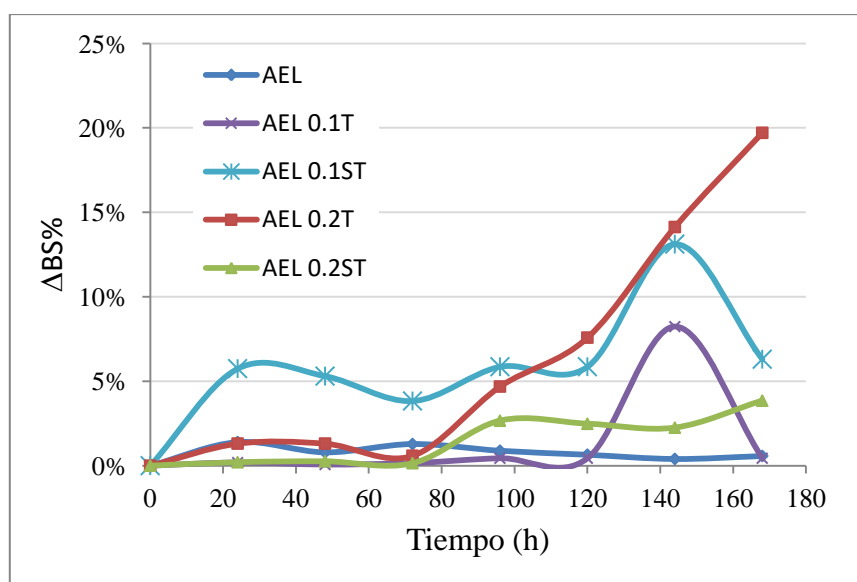


Figura 4.19:  $\% \Delta BS$  en función del tiempo de almacenamiento para SFFs con 3% de aceite esencial de limón sin tensioactivos y con 0.1 y 0.2% de tensioactivos (T: tween 80; ST: mezcla span80 y tween80).

Así, en base a los resultados obtenidos, las SFFs se prepararon sin agregado de agentes tensioactivos.

### 4.3.3 Caracterización reológica de las SFFs

Todas las SFFs presentaron un comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ), el cual fue ajustado satisfactoriamente ( $r^2 > 0.9$ ) por el modelo de Ostwald de Waele (Tabla 4.4) y no se observó dependencia del tiempo, ya que las curvas de flujo ascendente y descendente coincidieron. La incorporación de ESP prácticamente no afectó el comportamiento reológico de las SFFs debido al bajo contenido de sólidos del extracto y su elevada solubilidad en las SFFs acuosas, atribuido a su carácter hidrofílico. Sin embargo, en la proporción más alta (3%), se produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) del índice de flujo  $n$ , lo que puede deberse a la inhibición parcial del despliegue de las cadenas poliméricas en el medio acuoso por influencia del extracto alcohólico. Por otra parte, las SFFs que contenían AEL eran más viscosas y exhibían un mayor carácter de pseudoplástico que las de ESP, lo cual está en concordancia con la presencia de una fase dispersa oleosa según se explica en las micrografías obtenidas al SEM.

Tabla 4 4: Parámetros reológicos del modelo de Ostwald de Waale y viscosidad aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$  de las suspensiones formadoras de películas.

Formulación	$n$	$k \text{ (Pa s}^n\text{)}$	$\eta_{ap} \text{ (mPa s)}$
AM:Q	$0.93 \pm 0.02^b$	$0.048 \pm 0.006^c$	$34.0 \pm 1^{c,d}$
ESP1	$0.961 \pm 0.015^a$	$0.047 \pm 0.004^c$	$39.0 \pm 0.3^b$
ESP3	$0.966 \pm 0.009^a$	$0.039 \pm 0.002^c$	$33.0 (0.6)^d$
AEL1	$0.880 \pm 0.018^c$	$0.061 \pm 0.006^b$	$35.0 (0.8)^c$
AEL3	$0.862 \pm 0.001^c$	$0.078 \pm 0.001^a$	$41.0 (0.7)^a$

Los valores reportados corresponden al valor medio  $\pm$  desviación estándar. Se indica el valor medio  $\pm$  desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

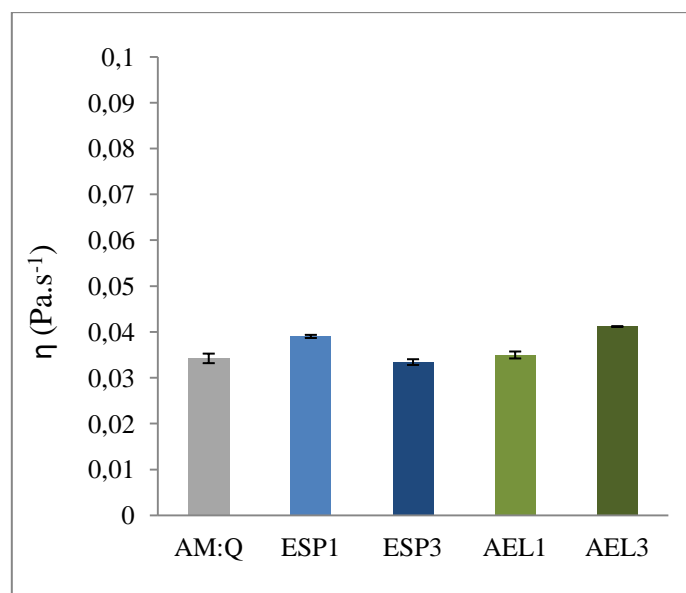


Figura 4.20: Viscosidad aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$  de las SFFs obtenidas a partir de diferentes formulaciones.

Es importante mencionar que los valores tanto de viscosidad como del ajuste de las curvas de comportamiento reológico presentados en este Capítulo se obtuvieron mediante ensayos rotacionales utilizando la geometría de sensores de cilindros concéntricos. Esto explica las diferencias observadas en relación al comportamiento reológico de las SFFs sin compuestos activos presentadas en los Capítulos anteriores, las cuales se obtuvieron con geometría plato-plato.

#### 4.3.4 Obtención de las películas activas compuestas

Las películas compuestas con AEL o ESP eran visualmente homogéneas ya que no se detectó separación de fases entre los componentes ni presentaron apariencia oleosa (tanto visualmente como al tacto), (Fig. 4.21). Además, todas las películas activas compuestas podían separarse fácilmente de las placas de teflón.

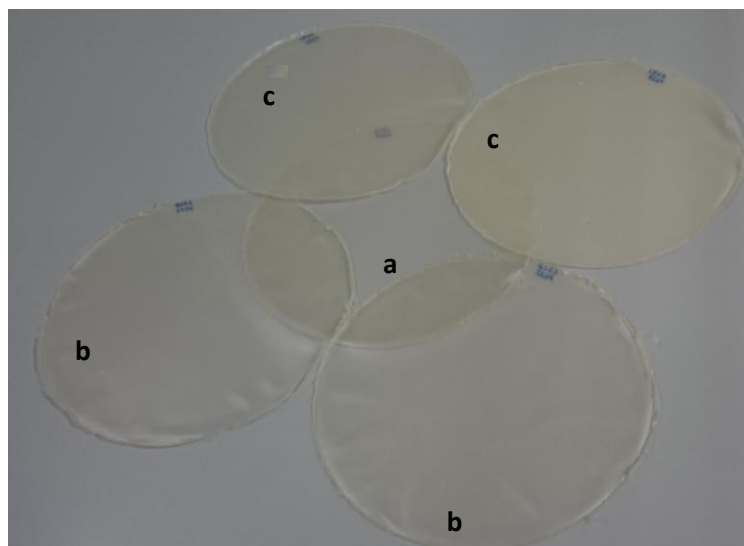


Figura 4.21: Fotografías de películas activas. a: AM:Q; b: ESP1 y ESP3; c: AEL1 y AEL3.

### 4.3.5 Caracterización de las películas compuestas activas

#### 4.3.5.1 Espesor, humedad y solubilidad

En la Tabla 4.5 se encuentran los valores de espesor, humedad y solubilidad de las películas obtenidas. El espesor de las películas fue distinto entre formulaciones debido a las diferencias en el contenido de sólidos totales de las formulaciones y, por lo tanto, la diferencia en la masa de sólidos vertidos por placa como se pudo apreciar con los valores de masa equivalente de sólidos que se encuentran en Tabla 4.5. La adición de ESP no afectó notablemente el espesor de las películas debido al bajo contenido de sólidos del extracto, mientras que las que contenían AEL presentaron mayor espesor de acuerdo con la mayor cantidad de sólidos vertidos en la placa. Además, en relación al espesor cabe mencionar que las SFFs que contienen AEL corresponden a emulsiones, con una distribución de tamaños de gotas bimodal, lo que afecta el espesor del material obtenido por moldeo y deshidratación.

Por otra parte, la solubilidad a 25°C se vio afectada por el contenido de aceite esencial: cuanto mayor fue la concentración de aceite, menor la solubilidad de la película debido al aumento del carácter hidrófobo de la matriz al añadir lípidos. La incorporación de ESP no afectó significativamente a la solubilidad de las películas probablemente debido a su baja fracción másica en las películas y su naturaleza hidrófila.

Tabla 4.5: Contenido de humedad, solubilidad y espesor de las películas compuestas activas.

Película	Humedad (g/100 g)	Solubilidad a 25°C (%)	Espesor (µm)
AM:Q	10.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	25.71 ± 0.05 <sup>a</sup>	80 ± 4 <sup>c</sup>
ESP1	10.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	24.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	81 ± 4 <sup>c</sup>
ESP3	11.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	26.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	79 ± 5 <sup>c</sup>
AEL1	8.97 ± 0.14 <sup>c</sup>	23.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	113 ± 7 <sup>b</sup>
AEL3	8.67 ± 0.01 <sup>c</sup>	20 ± 3 <sup>b</sup>	162 ± 10 <sup>a</sup>

Se indica el valor medio ± desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ).

El contenido de humedad de equilibrio de las películas siguió una tendencia similar a la solubilidad en agua a temperatura ambiente. Ghasemlou y col. (2013) encontraron efectos similares cuando añadieron aceites esenciales en matrices de biopolímeros, lo que puede explicarse por la disminución de la relación global de puntos activos para interacciones entre los componentes cuando una fase hidrófoba está presente en la matriz polimérica.

#### 4.3.5.2 Retención de aceite esencial en las películas

Teniendo en cuenta la naturaleza hidrofílica del ESP, se puede esperar su buena incorporación en la matriz. Entretanto, la composición de AEL incluye compuestos volátiles no solubles en agua que pueden evaporarse durante la etapa de secado de las películas, junto con el agua de la superficie de las mismas. Por ello, se analizaron los extractos lipídicos obtenidos a partir de los films por cromatografía de gases para cuantificar la cantidad final de limoneno proveniente del AEL presentes en las muestras. El análisis cromatográfico permitió calcular el contenido de limoneno en el aceite esencial de limón usado así como el incorporado en las películas compuestas activas. El contenido de limoneno en el AEL fue de 66%. A partir de la cantidad determinada de limoneno en las películas, se estimó su porcentaje de retención en películas secas, teniendo en cuenta el aceite esencial incorporado nominalmente. Las pérdidas estimadas de limoneno durante el proceso de formación de la película fueron del  $69 \pm 3\%$  independientemente del contenido inicial en las SFFs. A partir de estos datos y asumiendo que se produjeron pérdidas similares para los otros compuestos del AEL, el contenido restante del aceite esencial en

las películas secas fue 0,061 y 0,117 g/g de sólidos para las muestras AEL1 y AEL3, respectivamente.

#### 4.3.5.3 Desarrollo de color superficial

Las propiedades ópticas (brillo a 60° y transmitancia interna a 450 nm) y los parámetros de color de las películas se encuentran en la Tabla 4.6. Los parámetros  $h_{ab}^*$  y  $C_{ab}^*$  indican que todas las películas tenían un color amarillento, lo que coincidió con las observaciones visuales (Fig. 4.21). Las películas con la mayor concentración de compuestos activos (3% de AEL o de ESP) presentaron las mayores diferencias de color ( $\Delta E^*$ ) con respecto al control que aquellas que contenían 1% de ambos componentes. En general, la adición de compuestos activos aumentó el Chroma ( $C_{ab}^*$ ), 18.7% y 51.4% para ESP3 y AEL3, respectivamente. Con respecto al parámetro de luminosidad  $L^*$ , las películas ESP3 y AEL3 presentaron valores más bajos que las control (disminución de 6.2% y 3.6%).

Del mismo modo, los valores de brillo fueron más altos para las películas con AEL, mientras que las películas con ESP mostraron valores significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajos, en comparación con el control. El aumento de brillo promovido por el agregado de AEL podría atribuirse al hecho de que los lípidos libres actúan como rellenos de los microporos en la superficie de la película, reduciendo así la rugosidad superficial y aumentando el brillo (Ortega-Toro y col., 2014, Villalobos y col., 2005).

Todas las películas eran altamente transparentes según los valores de transmitancia interna, aunque dichos valores se redujeron mediante la incorporación de agentes activos, principalmente a mayor concentración y especialmente para las películas que contienen AEL (Tabla 4.6). La presencia de una fase dispersa en las películas que promueve la dispersión de la luz es responsable de este efecto (Jiménez y col., 2012).

Tabla 4.6: Parámetros de color, brillo y transparencia de las películas compuestas activas.

Película	$L^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}^*$	$\Delta E$	Brillo (60°)	Ti (450 nm)
AM:Q	$78.8 \pm 0.7^{a,b}$	$17.3 \pm 0.7^c$	$88.80 \pm 0.50^a$	-	$26.2 \pm 1.3^b$	$81.3 \pm 0.6^a$
ESP1	$77.3 \pm 0.9^{b,c}$	$18.1 \pm 0.7^c$	$87.40 \pm 0.70^c$	$1.8 \pm 1.3^c$	$15.5 \pm 1.5^c$	$80.9 \pm 1.4^a$
ESP3	$73.9 \pm 0.3^d$	$20.5 \pm 0.2^b$	$84.76 \pm 0.03^d$	$6.0 \pm 0.2^b$	$12.0 \pm 1.2^c$	$78.3 \pm 0.2^b$
AEL1	$79.4 \pm 1.2^a$	$17.7 \pm 2.0^c$	$88.50 \pm 0.40^{a,b}$	$2.4 \pm 0.9^c$	$37.0 \pm 4.0^a$	$80.8 \pm 0.6^a$
AEL3	$76.0 \pm 0.3^c$	$26.2 \pm 0.2^a$	$87.80 \pm 0.09^{b,c}$	$9.3 \pm 0.3^a$	$30.0 \pm 4.0^b$	$72.94 \pm 0.03^c$

Se indica el valor medio  $\pm$  desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ).

Por lo tanto, la incorporación de ESP o AEL provocó cambios en las propiedades ópticas de las películas almidón-quitosano, dependiendo de su concentración. Las películas se volvieron ligeramente más oscuras y amarillentas, y menos transparentes. ESP redujo el brillo de las películas, mientras que AEL dio lugar a películas más brillantes, lo cual fue más evidente cuando aumentó la concentración de este componente.

#### 4.3.5.4 Microscopía SEM: análisis de sección transversal y superficial

Las micrografías SEM de las películas control (AM:Q) muestran una estructura homogénea que se puede atribuir a la compatibilidad y miscibilidad de ambos polímeros (Fig. 4.22 A). Las micrografías de las películas compuestas activas con ESP1 y ESP3 exhibieron el mismo aspecto continuo y homogéneo que las control (Fig. 4.22 B y C), en concordancia con la compatibilidad de los componentes, como se dedujo del comportamiento reológico de las SFFs. Sin embargo, en muestras de AEL1 y AEL3, se puede observar claramente la presencia de *microgotitas* de aceite embebidas en la matriz polimérica (Figura 4.22 D y E). Las muestras de AEL3 presentan *microgotitas* de mayor tamaño en concordancia con la mayor concentración de fase dispersa y la posterior promoción de la floculación de gotitas durante la etapa de secado de la película. Las gotitas de aceite introdujeron discontinuidades en la red polimérica que podrían afectar el comportamiento mecánico y las propiedades de barrera de las películas (Jiménez y col., 2013).

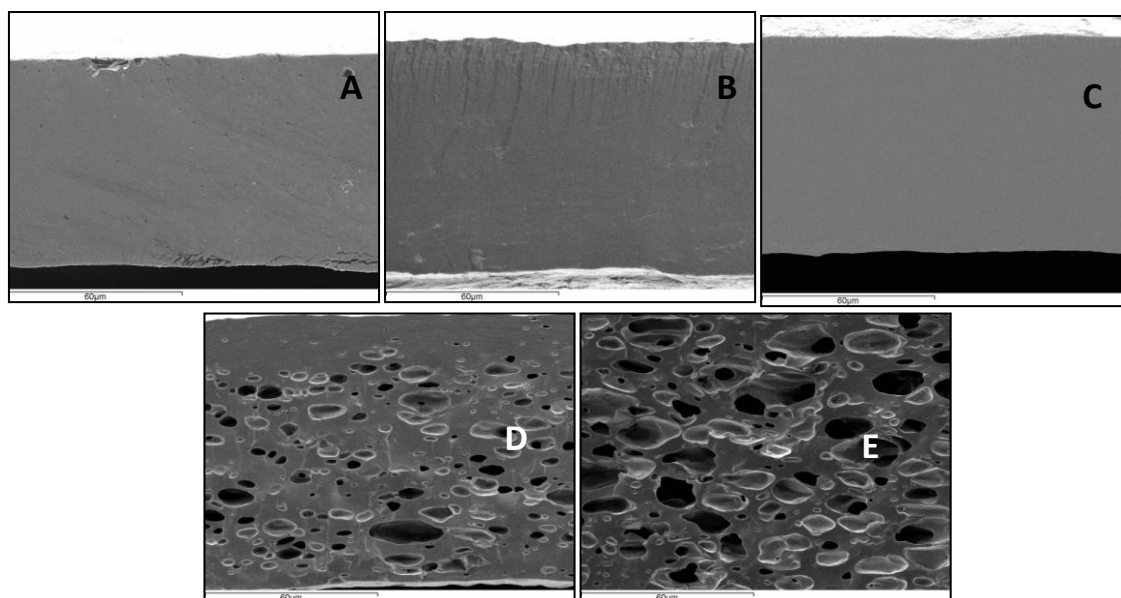


Figura 4.22: Micrografías electrónicas de barrido de películas activas. A: AM:Q; B: ESP1; C: ESP3; D: AEL1; E: AEL3.



#### 4.3.5.5 Propiedades mecánicas y de barrera

En la Tabla 4.7 se presentan los parámetros mecánicos a la tracción de las películas compuestas: esfuerzo ténsil o resistencia a la tracción (TS, MPa), elongación a la ruptura (EB, %) y módulo elástico (EM, MPa). Como es sabido, TS representa la resistencia a la ruptura; mientras que EB describe la capacidad de estiramiento y EM está relacionado con la rigidez de las películas. Todos estos parámetros están relacionados estrechamente con la microestructura de los materiales. El comportamiento a la tracción de las películas estuvo fuertemente afectado por la incorporación de ESP y AEL, ambos componentes condujeron a películas menos rígidas y menos resistentes a la ruptura (valores TS más bajos), pero resultaron más deformables (valores EB más altos) que los controles. Esta disminución de la rigidez y el aumento de la extensibilidad podrían atribuirse al debilitamiento de las interacciones en la matriz polimérica debido a la presencia de otros compuestos (solubilizados o dispersos) que interrumpen dicha interacción entre las cadenas de ambos biopolímeros. El AEL produjo efectos más marcados debido a su mayor concentración en la matriz y a la falta de miscibilidad del polímero, que introdujo un gran número de discontinuidades en la matriz como se puede observar en las micrografías SEM (Fig. 4.22). Sin embargo, el aumento inducido en la capacidad de estiramiento de la película causada por el aceite esencial indica que no sólo provocó discontinuidades en la matriz sino que también interactuó con las cadenas poliméricas, mejorando su capacidad de deslizamiento durante el ensayo de tracción, promoviendo así la extensibilidad de la película (Sánchez-González y col., 2010; Kavooosi y col., 2013; Tongnuanchan y col., 2012, Bonilla y col., 2011). La adición de ESP también aumentó la capacidad de estiramiento de la película, aunque su efecto sobre TS y EM fue menor. Estos resultados también sugieren el desarrollo de interacciones con cadenas poliméricas sin producir discontinuidades en la matriz debido a la mayor compatibilidad entre componentes de ESP y las cadenas biopoliméricas.

Tabla 4.7: Propiedades mecánicas a la tracción de películas con componentes activos.

Película	Módulo elástico EM (MPa)	Esfuerzo ténsil TS (MPa)	Elongación a la ruptura EB (%)
AM:Q	151 ± 20 <sup>a</sup>	18.3 ± 1.9 <sup>a</sup>	57 ± 3 <sup>d</sup>
ESP1	120 ± 8 <sup>b</sup>	14.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	58.3 ± 1.3 <sup>c,d</sup>
ESP3	63 ± 12 <sup>d</sup>	14.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	67 ± 4 <sup>a</sup>
AEL1	84 ± 6 <sup>c</sup>	11.8 ± 0.8 <sup>c</sup>	62 ± 2 <sup>b,c</sup>
AEL3	30 ± 12 <sup>d</sup>	6.7 ± 1.4 <sup>d</sup>	66 ± 6 <sup>a,b</sup>

Se indica el valor medio ± desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ )

La Tabla 4.8 muestra las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno de las películas, en las cuales no se puede observar un efecto notable de los compuestos activos incorporados.

Tabla 4.8: Propiedades de barrera al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO<sub>2</sub>) de las películas.

Película	PVA (g mm kPa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	PO <sub>2</sub> · 10 <sup>-14</sup> (cm <sup>3</sup> m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )
AM:Q	7.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.2 <sup>a</sup>
ESP1	7.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.7 <sup>a</sup>
ESP3	7.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.47 ± 0.11 <sup>a</sup>
AEL1	7.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	-
AEL3	7.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	-

Se indica el valor medio ± desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ).

Era de esperar que la incorporación de una fase oleosa en las películas redujera la penetración de las moléculas de agua debido a su naturaleza hidrófoba y al aumento de la tortuosidad en la vía de difusión en la matriz, y que esto provoque un aumento de la resistencia al pasaje del vapor de agua a través de la película (Sánchez-González y col. 2010). Sin embargo, este efecto no se observó para las películas con AEL. Kanmani y

Rhim (2014) trabajando con películas a base de agar también informaron que la propiedad de barrera al vapor de agua no fue afectada por la incorporación de ESP en concentraciones similares a las utilizadas en el presente estudio. Estos autores también señalan que se han reportado algunos resultados polémicos sobre el efecto de la adición de aceite esencial en la PVA de películas biodegradables (Hong y col., 2009; Song y col. 2012; Lim y col. 2010; Jang y col., 2011).

Asimismo, la permeabilidad al oxígeno no fue afectada por la incorporación de ESP, manteniendo las películas activas una eficacia similar como barreras al oxígeno que aquellas compuestas a base de polisacáridos. En el caso de las películas que contienen AEL, la permeabilidad al oxígeno no se pudo medir debido a las restricciones del equipo, ya que los compuestos volátiles presentes afectan a la sensibilidad del sensor coulométrico del mismo.

#### **4.3.5.6 Propiedades térmicas**

La Fig. 4.23 muestra las curvas de pérdida de peso en función de la temperatura para las películas obtenidas por TGA (A), junto con la curva derivada (DTGA) (B).

Todas las formulaciones muestran un pico inicial a 100°C aproximadamente que puede atribuirse a la pérdida del agua ligada en la película (Luo y col., 2012). Posteriormente se observa una segunda etapa de pérdida de peso en las películas con AEL que puede atribuirse a la liberación de los volátiles y finalmente, a aproximadamente 275°C, se produce la degradación de ambos polímeros (Martínez-Camacho y col., 2010). Se puede apreciar que las películas con AEL tuvieron mayor pérdida de peso que las que contenían ESP y las control (AM:Q), debido a la pérdida de aceites esenciales, principalmente limoneno.

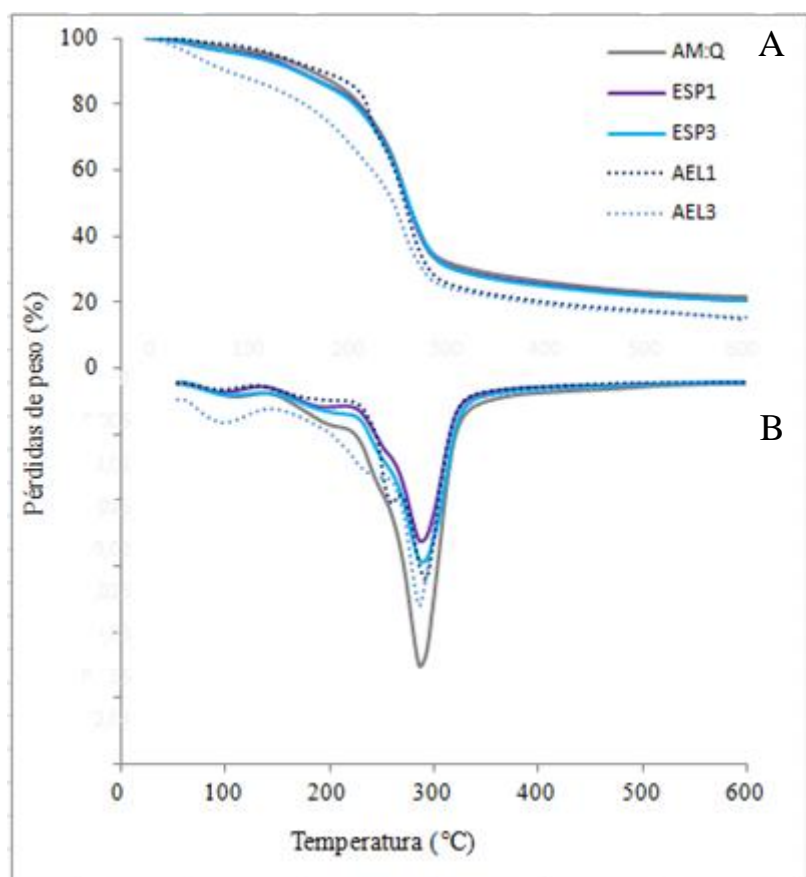


Figura 4.23: Curvas termogravimétricas TG (A) y su primera derivada DTG (B) para películas compuestas activas.

La Tabla 4.9 muestra la temperatura de degradación térmica a la tasa de degradación máxima ( $T_{\text{pico}}$ ), la pérdida de peso obtenida mediante análisis termogravimétrico (TGA) y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) registrada en el análisis por DSC. La temperatura de transición vítrea se registró en la segunda etapa de calentamiento del análisis DSC para evitar la interferencia del agua contenida en la película que se elimina en la primera etapa de calentamiento. En la Fig. 4.24 se presenta un termograma obtenido para la formulación control, en el cual se observa la temperatura de transición vítrea.

La incorporación de ESP o AEL no afectó significativamente ( $p > 0.05$ ) a la temperatura de transición vítrea de las películas. Los valores hallados se encuentran dentro del rango que se informó para películas de almidón de maíz plastificado (Ortega-Toro y col., 2015).

Tabla 4.9: Temperatura de degradación del polímero, peso residual de degradación a 500°C y temperatura de transición vítrea del almidón ( $T_g$ ) para las películas desarrolladas.

Película	$T_{pico}$ (°C)	% Peso residual	$T_g$ (°C)
AM:Q	$272.3 \pm 0.4^b$	$23.4 \pm 0.6^a$	$110.2 \pm 6^{a,b}$
ESP1	$273.3 \pm 1.4^b$	$22.7 \pm 0.7^a$	$115.2 \pm 1.6^a$
ESP3	$273.4 \pm 0.4^b$	$22.4 \pm 0.9^a$	$104.7 \pm 1.2^b$
AEL1	$275.2 \pm 0.3^a$	$17.4 \pm 0.2^b$	$113.3 \pm 1.6^a$
AEL3	$270.6 \pm 0.9^c$	$16.3 \pm 1.9^b$	$113.4 \pm 0.2^a$

Se indica el valor medio  $\pm$  desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ )

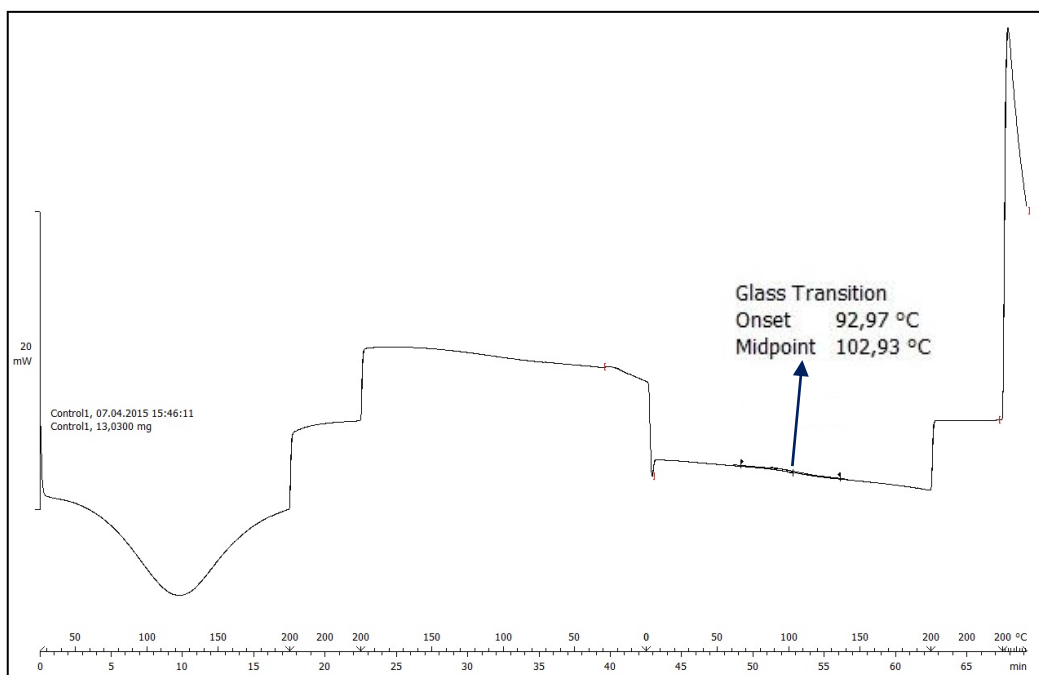
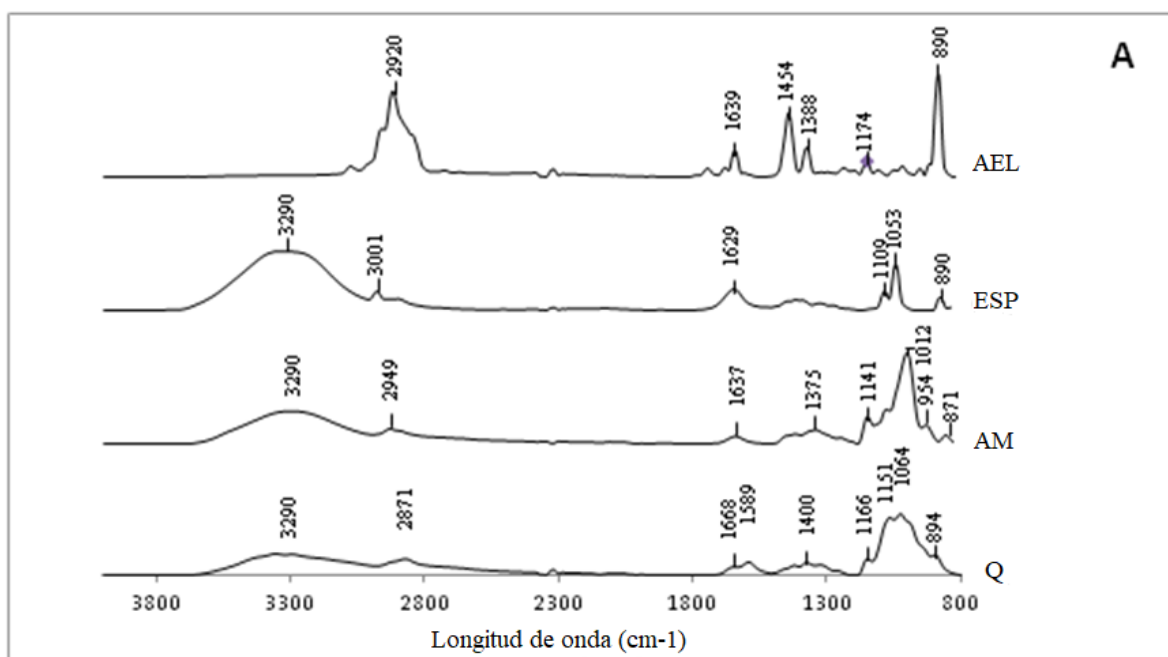


Figura 4.24: Termograma de película compuesta de almidón y quitosano (AM:Q) y temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

#### 4.3.5.7 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

Las Fig. 4.25 A y B muestran los espectros FTIR obtenidos para componentes puros y películas compuestas, respectivamente, con el fin de comparar las posiciones de banda y detectar posibles desplazamientos. La banda ancha localizada a  $3290\text{ cm}^{-1}$ , observada para el almidón de maíz puro, el quitosano y el ESP, corresponde con los modos de vibración de grupos -OH del agua absorbida y del propio polímero (García y col., 2009). Los picos a  $2920$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  están relacionados con los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  presentes (Zhang y col., 2012).

A partir del espectro de quitosano puro, se pueden observar dos bandas características: la banda de amida I, a  $1643\text{ cm}^{-1}$  correspondiendo al estiramiento de carbonilo, y la banda de amida II correspondiente a  $\text{NH}_2$  curvado a  $1575\text{ cm}^{-1}$  (Duarte y col., 2002). Los picos exhibidos a  $1151$  y  $1064\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de quitosano corresponden a un estiramiento asimétrico del puente C-O-C y a vibraciones esqueléticas que implican el estiramiento C-O, respectivamente, siendo ambas típicas del quitosano (Rivero y col., 2010). Los picos agudos a  $1020\text{ cm}^{-1}$  están relacionados con las vibraciones de estiramiento C-O (Zhang y col., 2012; Jiménez y col., 2014).



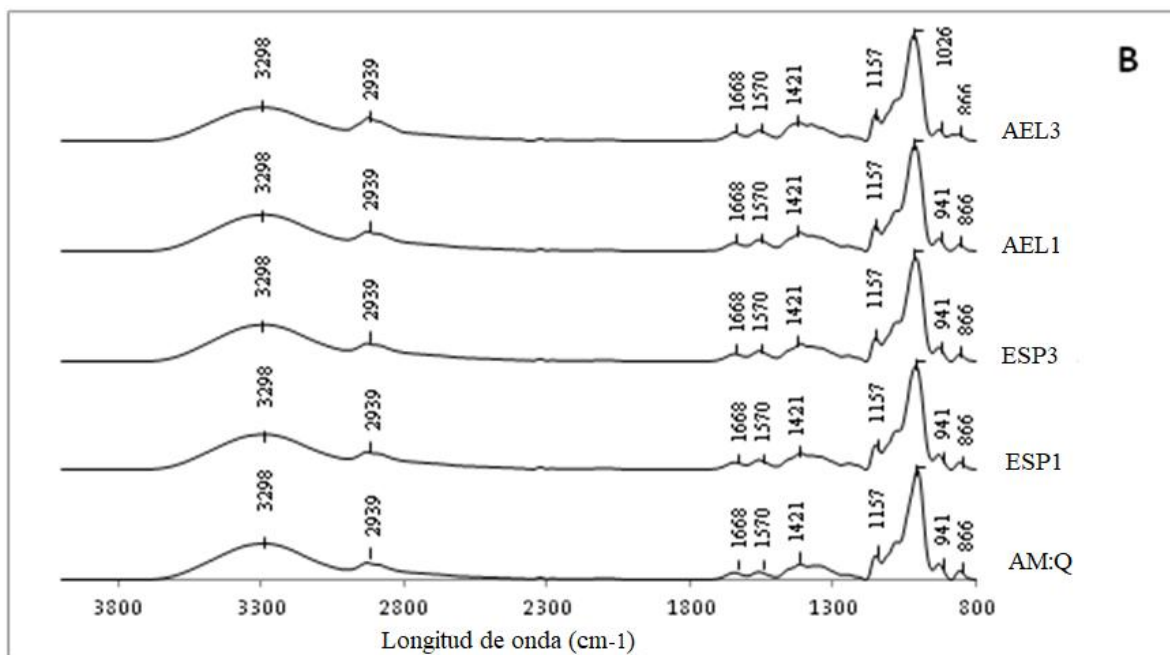


Figura 4.25: Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier de diferentes componentes (A) y de películas compuestas de almidón y quitosano (B).

En los espectros de aceite esencial de limón hay un pico principal a  $890\text{ cm}^{-1}$  relacionado con el estiramiento C-H que es característico de los compuestos aromáticos (Sánchez Aldana y col., 2014). Asimismo, la banda asimétrica más fuerte alrededor de  $3100\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ , se asocia a la presencia de hidrocarburos alifáticos e insaturados relacionados con los componentes terpenoides presentes en AEL. Los espectros de ESP exhiben una banda de absorción amplia a  $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ , relacionada con las vibraciones -OH típicas de compuestos aromáticos / fenólicos (Boumail y col., 2013), revelando el carácter hidrófilo de este compuesto activo. Además, el pico a  $890\text{ cm}^{-1}$  descrito previamente también se observa en espectros de ESP.

Por otra parte, los espectros de las películas compuestas activas eran todos similares debido a su composición similar. Los espectros de FTIR de las películas compuestas exhibían las señales típicas tanto de almidón como de quitosano. El aumento de amplitud de la señal de  $3300\text{ cm}^{-1}$  en las películas compuestas es indicativo del desarrollo de interacciones de enlace de hidrógeno entre los componentes, que es el mecanismo de interacción predominante entre polímeros hidrófilos. Los espectros de películas compuestas presentaron pequeñas modificaciones en la posición de algunas bandas dentro del rango de  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  que están relacionadas con grupos amino y carbonilo, indicando así interacciones efectivas entre las cadenas de almidón y quitosano.

Del mismo modo, en las películas a base de quitosano se observó la aparición de un hombro a  $1460\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$  y se atribuyó al estiramiento del grupo  $\text{CH}_2$  (Wilhelm y col., 2003, Bof y col., 2015). Esta señal indica que el plastificante añadido estaba unido a las cadenas poliméricas.

Además, en los espectros de las películas compuestas activas con agregado de AEL o ESP no hay evidencia de reacciones químicas entre componentes debido a la falta de nuevos enlaces covalentes en los espectros. Resultados similares fueron informados para películas activas biodegradables a base de almidón y caseinato con inclusión de nanoliposomas (Jiménez y col., 2014).

### **4.3.5.8 Análisis de componentes principales**

Se llevó a cabo un ACP, teniendo en cuenta las principales propiedades de las películas, con el fin de analizar las interdependencias de las variables métricas y poder así comparar más exhaustivamente las diferentes formulaciones. La Fig. 4.26 presenta el gráfico de BiPlot de los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) de películas compuestas que contienen ESP o AEL como compuestos activos a las concentraciones ensayadas. CP1 y CP2 explicaron el 90.8% de la varianza (63.6% CP1). En cuanto a CP1, las películas de control (AM:Q) y las de ESP1 y ESP3 son muy próximas, mientras que las películas que contienen AEL (especialmente AEL3) fueron más diferenciadas (Fig. 4.26). El CP2, que explica un porcentaje mucho menor de varianza (27.2%), sólo diferenció notablemente las películas con diferente proporción de ESP, probablemente debido al impacto de la concentración de ESP en algunas propiedades de la película como los parámetros de tracción y  $T_g$ , como se comentó anteriormente.

Por lo tanto, a partir de análisis ACP se puede destacar que la principal diferencia entre las formulaciones fue introducida por el AEL, en concordancia con la falta de miscibilidad de sus componentes en las cadenas de polímero y la presencia de una fase dispersa en la matriz polimérica. Así, CP1 se asoció al tipo de compuesto activo incorporado y CP2 a la concentración del mismo utilizada en la SFF.



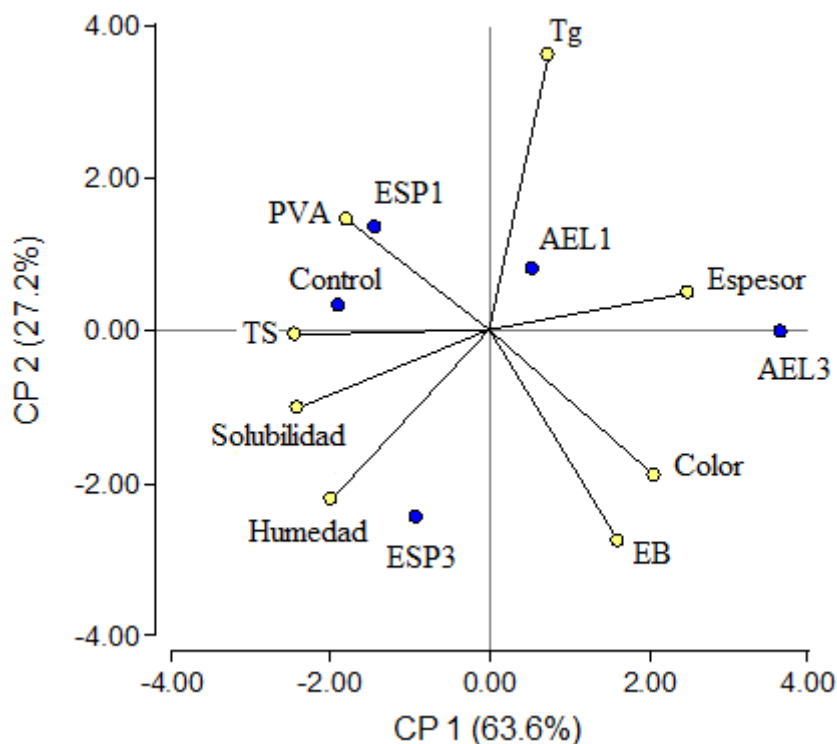


Figura 4.26: Análisis de componentes principales de los dos componentes principales (CP1 y CP2) de películas con 1 y 3% de compuestos activos (AEL o ESP).

#### 4.3.6 Evaluación de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante de ESP y AEL puros se cuantificó en términos de los valores de TEAC (Capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y los resultados fueron 143 g/L y 157 g/L para ESP y AEL, respectivamente, lo que supone una actividad antioxidante mucho menor que Trolox (la misma reducción de absorbancia fue producida por 250,29 mg/L de Trolox). Sin embargo, los extractos de película que contienen tanto ESP como AEL no produjeron una reducción significativa de los valores de absorbancia en el ensayo, lo que puede atribuirse a una cantidad insuficiente de compuestos activos. Incluso suponiendo su extracción total de las películas, los niveles de concentración en el extracto deben ser mucho más bajos que los valores de TEAC (2.2 g/L en el mejor de los casos: AEL3).

#### 4.3.7 Estudio de la capacidad antimicrobiana

Los resultados del ensayo de capacidad antimicrobiana se muestran en la Tabla 4.10. El AEL puro exhibió actividad antimicrobiana sólo en el caso de bacterias Gram +. Se observó una tendencia similar para las películas que contienen AEL y, como es de esperar,

su actividad aumenta con la concentración del compuesto activo. En el caso del ESP, éste resultó eficaz contra Gram + y Gram - sólo cuando se aplicó directamente en los discos de papel (ESP puro). Resultados similares de la actividad antimicrobiana de ESP contra *E. coli* y *L. monocytogenes* fueron reportados por Kanmani & Rhim (2014).

Los patógenos Gram - fueron menos susceptibles que los Gram +, debido probablemente a que los primeros tienen una membrana adicional en sus células, lo que podría dificultar la difusión de compuestos antimicrobianos. Sin embargo, las películas ESP1 y ESP3 no mostraron actividad antimicrobiana, lo que se puede atribuir a la baja concentración activa difundida al medio de cultivo, que no alcanzó la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los microorganismos ensayados. Por lo tanto, la cinética de liberación de los compuestos activos debe evaluarse para comprender la actividad antimicrobiana. Los componentes puros no mostraron actividad antifúngica (formación de halos) contra los hongos ensayados en las concentraciones utilizadas. Sin embargo, es importante señalar que todas las películas desarrolladas presentaron inhibición por contacto excepto las que contenían ESP frente a *Alternaria alternata* (Tabla 4.10).

Tabla 4.10: Actividad antimicrobiana de películas activas y AEL y ESP puros frente a algunos microorganismos.

	AM:Q	ESP1	ESP3	ESP Puro	AEL1	AEL3	AEL Puro
<i>Listeria innocua</i>	NA (-)	NA (-)	NA (-)	30.76 ± 2.53 <sup>b,c,1</sup> (-)	29.25 ± 3.08 <sup>c</sup> (-)	34.42 ± 4.11 <sup>b</sup> (-)	39.43 ± 3.09 <sup>a</sup> (-)
<i>Escherichia coli</i>	NA (-)	NA (-)	NA (-)	22.13 ± 0.21 <sup>2</sup> (-)	NA (-)	NA (-)	NA (-)
<i>Alternaria alternata</i>	NA (+)	NA (+)	NA (+)	NA (+)	NA (-)	NA (-)	NA (+)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*
<i>Penicillium expansum</i>	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)*	NA (-)	NA (-)	NA (-)

Se indica el valor medio ± desviación standard. ESP: extracto de semillas de pomelo; AEL: aceite esencial de limón. Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0.05$ ). Números diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre microorganismos ( $p < 0.05$ ). NA indica película no activa, sin halo de crecimiento; los signos + y - indican con y sin crecimiento debajo de la película, respectivamente.

Lo observado en los resultados en la actividad inhibitoria contra bacterias y mohos se corresponde con lo informado por otros autores (Coma y col., 2002; Wang y col., 2011) que encontraron que la actividad antimicrobiana de las películas con quitosano ocurrió sin

migración de agentes activos. Es decir que no se observó difusión a través del medio de agar adyacente, de modo que la inhibición de los organismos fue por contacto directo con los sitios activos del quitosano (Coma y col., 2002; Elsabee y col., 2013).

Esto puede deberse a la retención del aceite esencial en la matriz de quitosano, con la consiguiente ausencia de difusión del aceite al agar circundante. Zivanovic y col. (2005) encontraron que el efecto inhibitorio de los aceites esenciales en las películas de quitosano se ve atenuado respecto a los aceites solos y lo atribuyen a la liberación más lenta de los compuestos activos en la matriz de quitosano.

El quitosano en estado sólido experimenta un modo de reacción de superficie a superficie y local, en lugar de un modo de contacto completo que se produce en estado líquido. La acción del quitosano sobre las células microbianas podría ocurrir por interacción con la superficie celular y alteración de la permeabilidad de las células, o por formación de una capa impermeable alrededor de estas, bloqueando así el transporte de los solutos esenciales hacia el interior de la célula (Kong y col., 2010).

### **4.4 Conclusión**

Para el desarrollo de las SFFs compuestas activas se requirió una etapa adicional de emulsificación, sin embargo no fue necesario el agregado de agentes tensioactivos a las formulaciones. El comportamiento reológico de las SFFs no se modificó sustancialmente por el agregado de los compuestos activos.

Las películas compuestas a base de almidón y quitosano que incorporan AEL y ESP como componentes activos potenciales presentaron un color amarillento, siendo esta característica más marcada en el caso de películas AEL a la concentración más alta. Las micrografías SEM evidenciaron una incorporación homogénea de ESP a la matriz de la película, mientras que se observaron microgotas de AEL en las secciones transversales de las películas, las que se dispersaron en la matriz polimérica. Las propiedades mecánicas a la de tracción se vieron afectadas por la incorporación de compuestos activos y su concentración, resultando películas menos rígidas y resistentes, pero más flexibles que las películas compuestas control, aunque no modificaron las propiedades de barrera al oxígeno y al vapor de agua de los films. En general, las películas desarrolladas presentaron inhibición por contacto contra las bacterias y mohos ensayados.

Así, las películas biodegradables compuestas a base de quitosano-almidón con la incorporación de AEL y ESP, que tienen buenas propiedades funcionales y actividad

antibacteriana, resultan una alternativa prometedora para ser utilizadas como material de envasado, para aumentar la inocuidad de los alimentos y prolongar su vida útil.

#### 4.5 Referencias bibliográficas

- AL-Jabri, N.N. & Hossain, M.A. (2014). Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. *Beni-suef Universit Journal of basic and applied sciences*, 3, 247-253.
- AL-Jabri, N.N. & Hossain, M.A. (2018). Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. *Journal of King Saud University – Science*, 30, 14–20.
- Andreatta, A.E, Longo, M.B., Utrera, C., Saavedra, M. & Foco, G. (2008). Caracterización de aceites esenciales del Departamento San Justo (Córdoba). Recuperado de [http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal\\_frvm/CyTAL\\_2012/TF/TF008.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2012/TF/TF008.pdf)
- ASTM (1995). Standard test methods for water vapour transmission of materials. Standards Designations: E96–95. En: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, pp. 406–413.
- ASTM (2011). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. En: Annual Book of American Standard Testing Methods, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 162-170.
- Bautista Baños, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E. & Wilson, C.L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22, 1087–1092.
- Bill, M., Sivakumar, S., Korsten, L. & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea Americana* Mill) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159-167.
- Bof, M.J., Bordagaray, V.C., Locaso, D.E. & García, M.A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids*, 51, 281–294.
- Boumail, A., Salmieri, S., Klimas, E., Tawema, P.O., Bouchard, J. & Lacroix, M. (2013). Characterization of trilayer antimicrobial diffusion films (ADFs) based on methylcellulose–polycaprolactone composites. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 61(4), 811–821.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. & Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. *Food Control*, 54, 111-119.

- Choi, W.Y., Park, H.J., Ahn, D.J., Lee, J. & Lee, C.Y. (2002). Wettability of chitosan coating solution on “Fuji” apple skin. *Journal of Food Science*, 67(7), 2668–2672.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162–1169.
- Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvao, M.R., & Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1–3), 1–8.
- El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E.H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R. & Elaïssari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 220-243.
- Elsabee, M.Z. & Abdou, E.S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1819–1841.
- Fraschina, S. (2017). Políticas económicas. Consultado el 20/03/018. Disponible online: [http://www.todoagro.com.ar/documentos/2017/crisis\\_citricola.pdf](http://www.todoagro.com.ar/documentos/2017/crisis_citricola.pdf)
- Garcia, N.L., Fama, L., Dufresne, A., Aranguren, M. & Goyanes, S. (2009). A comparison between the physico-chemical properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, 42, 976–982.
- Ghasemlou, M., Aliheidaric, N., Fahmid, R., Shojaee-Aliabadie, S., Keshavarzf, B., Crang, M.J. & Khaksare, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1117–1126.
- Griffin, W.C. (1949). Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. *Journal of Cosmetic Science*, 1, 311-326.
- Hasenhuettl, G.L. & Hartel, R.W. (Ed.). (2008). *Food Emulsifiers and Their Applications*. Nueva York: Springer. DOI: 10.1007/978-0-387-75284-6.
- Hernández Jiménez, C. (2014). *Elaboración y caracterización de película comestible a base de quitosano y aceite esencial de limón*. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Veracruzana, Méjico.
- Hong, Y.H., Lim, G.O. & Song, K.B. (2009). Physical properties of Gelidium corneum gelatin blends films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *Journal of Food Science*, 74(1), 6-10.

- Jang, S.A., Shin, Y.J. & Song, K.B. (2011). Effects of rapeseed protein gelatin film containing grapefruit seed extract on 'Maehyang' strawberry quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(3), 620–625.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P. & Chiralt, A. (2012). Effect of recrystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302–310.
- Jiménez, A., Fabra, M.J., Talens, P. & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antioxidant capacity of starch-sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, 116(3), 695–702.
- Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. & Tehrany, E.A. (2014). Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 159–169.
- Kanmani, P. & Rhim, J.-W. (2014). Antimicrobial and physicalmechanical properties of agar-based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers*, 102, 708–716.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. & Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- Lim, G.O., Jang, S.A. & Song, K.B. (2010). Physical and antimicrobial properties of Gelidium corneum/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract and thymol. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 415–420.
- López Muñoz, G.A. (2011). Implementación de un sistema de Espectroscopia Foto acústica para la caracterización termo-óptica de aceites esenciales cítricos. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Mabry, T., Markham, K.R. & Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-88458-0. 354.
- Márquez, A.L., Palazolo, G.G & Wagner, J.R. (2005). Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 1: Estudios de estabilidad y determinación de las formulaciones. *Grasas y Aceites*, 56, 59-66.
- Miranda-Castro, S.P. (2016). Chapter 3: Application of Chitosan in Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. En: *Chitosan in the Preservation of Agricultural*

- Commodities. Eds. S. Bautista Baños, G. Romanazzi & A. Jiménez-Aparicio. Academic Press, 67-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00003-3>.
- Mohamadi, A., Hashemi, M. & Hosseini, S.M. (2015). Chitosan nanoparticles loaded with Cinnamomum zeylanicum essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 203–213.
- Mc Hugh, T.H., Avena-Bustillos, R. & Krochta, J.M. (1993). Hydrophobic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Moufida, S. & Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62(8), 1283–1289.
- Muñoz, Z., Moret, A. & Garcés, S. (2009). Assessment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. on tomatoes and grapes. *Crop Protection*, 28, 36–40.
- New Directions Aromatics. Disponible online: <https://www.newdirectionsaromatics.com/products/essential-oils/lemon-natural-blend-essential-oil.html>. Consultado el 15/03/18.
- Orafidiya, L.O & Oladimeji, F.A. (2002). Determination of the required HLB values of some essential oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 237, 241-249.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P. & Chiralt, A. (2014). Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 38, 66–75.
- Ortega-Toro, R., Collazo-Bigliardi, S., Talens, P. & Chiralt, A. (2015). Influence of citric acid on the properties and stability of starch-polycaprolactone based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 133. doi:10.1002/app.42220.
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A. & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- Perdones, A., Escriche, I., Chiralt, A. & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 197, 979–986.
- Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P. & Dubey, N.K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food Control*, 89, 1-11.



- Rao, J. & McClements, D.J. (2012). Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. *Food Hydrocolloids*, 26, 268-276.
- Remya, S., Mohan, C.O., Venkateshwarlu, G., Sivaraman, G.K. & Ravishankar, C.N. (2017). Combined effect of O<sub>2</sub> scavenger and antimicrobial film on shelf life of fresh cobia (*Rachycentron canadum*) fish steaks stored at 2°C. *Food Control*, 71, 71-78.
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2010). Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 270–276.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A. & Fernández-López, J. (2013). In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30, 386-392.
- Sabagui, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M. & Ziaifar, A.M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 224–228.
- Saho, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D. & Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 37–43.
- Sánchez Aldana, D., Contreras-Esquivela, J.C., Nevárez-Moorillón, G.V. & Aguilar, C.N. (2014). Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón Mexicano. *CyTA - Journal of Food*, 12, 1–9.
- Sanchez-Gonzalez, L., Cháfer, M., Chiralt, A. & Gonzalez-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277–283.
- SENASA (2015). HLB. Consultado: 14/05/18. Disponible online: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-vegetal/frutales/produccion-primaria/programas-fitosanitarios/hlb>.
- Song, H.Y., Shin, Y.J. & Song, K.B. (2012). Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 541–547.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A. & Nunes, M.L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587–595.

- Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill) Manden & Scheng. *Journal of Food Engineering*, 69(3), 335–342.
- Timoteo dos Santos, N.S., Alves Athayde Aguiar, A.J., Vasconcelos de Oliveira, C.E., Veríssimo de Sales, C., Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., Montenegro Stamford, T.C. & Leite de Souza, E. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32, 345-353.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23, 536–547.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G. & Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 53–61.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulate* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Control*, 19 (12), 1130–1138.
- Viuda-Martos, M., El Gendy, N.G.S., Sendra, E., Fernández-López, J., Abd El-Razik, K.A., Omer, E.A, & Pérez-Alvarez, J.A. (2010). Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9063-9070.
- Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., Jung, H. & Leng, X. (2011). Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23), 12411–12419. <https://doi.org/10.1021/jf203165k>.
- Wilhelm, H., Sierakowski, M., Souza, G. & Wypych, F. (2003). Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52, 101–110.
- Xu, W., Qu, W., Huang, K., Guo, F., Yang, J., Zhao, H., & Luo, Y.-B. (2007a). Antibacterial effect of grapefruit seed extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 126–133.

- Xu, W-T., Huang, K-L., Guo, F., Qu, W., Yang, J-J., Liang, Z-H. & Luo, Y-B. (2007b). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 86-94.
- Zhang, H.Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Ponçot, M., Linder, M. & Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 618–627.
- Zivanovic, S., Chi, S. & Draughon, A.F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), 45–51.

# **CAPÍTULO 5**

---

**APLICACIÓN DE PELÍCULAS COMO ENVASE PARA LA  
CONSERVACIÓN DE ARÁNDANOS**

## Capítulo 5. Aplicación de películas como envase para la conservación de arándanos

### 5.1 Introducción

Los arándanos son frutos muy perecederos y se deterioran rápidamente debido, principalmente, a que poseen una alta tasa respiratoria, la cual aumenta notablemente con la temperatura. Las manifestaciones de este deterioro se evidencian en la aparición de deshidratación, ablandamiento, pérdida de jugo a través de las heridas y crecimiento de mohos, entre otras (Perkins-Veazie y col., 2008; Wang y col., 2010); con lo cual el resultado es una fruta no comercializable.

La aplicación de tecnologías de conservación para evitar la pérdida de calidad comercial, y por ende las pérdidas económicas, tiene un relevante interés regional, ya que la mitad de la producción argentina se cosecha en la provincia de Entre Ríos, principalmente en el departamento de Concordia (37% del área de cultivo) y 20% en la provincia de Buenos Aires (Comité Argentino de Arándanos, 2015). Este volumen de fruta fresca se destina en su mayor parte al mercado de exportación, y se ha encontrado que las principales causas de pérdidas de calidad de los arándanos en los lugares de destino están asociadas a podredumbres producidas por mohos. Estos microorganismos pueden esporular y resistir los tratamientos poscosecha comenzando a infectar la fruta acondicionada en containers, mientras se dirige a los mercados internacionales, con la consecuente pérdida económica que esto representa.

Los arándanos de la Región de Salto Grande, dentro de la cual está comprendida la provincia de Entre Ríos, presentan mayor probabilidad de sufrir podredumbres por *Alternaria spp.* (Bello y col., 2010; Munitz, 2013; Zapata y col., 2013; Heredia, 2015) y *Botrytis cinerea* (Vásquez y col., 2007; Heredia, 2015). Las infecciones que resultan en las podredumbres poscosecha típicamente ocurren a través de la cicatriz del tallo después de que se cosechan las bayas y la temperatura óptima para el desarrollo de las enfermedades es de 20°C.

Actualmente, las estrategias de conservación poscosecha de arándanos frescos consisten en el empleo de diversas tecnologías, ya sea solas o combinadas, tales como atmósfera modificada, ozonización, radiación UV, fumigación con SO<sub>2</sub>, y temperaturas de refrigeración cercanas al punto de congelación de la fruta (Chiabrandó & Giacalone, 2011; Zheng y col., 2008; Cantín y col., 2011; Duan y col., 2011).

El tratamiento alternativo ideal para controlar las enfermedades poscosecha debe ser asequible y fácil de implementar, no debe tener ninguna influencia negativa en la fruta, el medio ambiente o la salud humana, y debe estar de acuerdo con la seguridad alimentaria (Romanazzi y col., 2012). En este sentido los recubrimientos y películas biodegradables constituyen una opción interesante en auge a nivel mundial y que actualmente se aplica a escala industrial principalmente en el procesamiento de cítricos y pomáceas.

Mannozi y col. (2017), Abugoch y col. (2016) y Sun y col. (2014) han trabajado en la aplicación de recubrimientos sobre la piel de arándanos para prolongar su vida poscosecha. Sin embargo, pruebas preliminares realizadas en el laboratorio, indican que esta metodología no sería adecuada ya que el empleo de recubrimientos modifica la capa cerosa que recubre la piel de la fruta, conocido como *bloom*, el cual es un indicativo de la calidad de la misma. Chu y col. (2018) han encontrado que al remover esta capa cerosa natural de la fruta, se aceleran los procesos de deterioro y pérdidas de peso, reduciendo la vida útil, así como la calidad sensorial y nutricional de los arándanos.

La estrategia propuesta en este trabajo de Tesis fue utilizar las películas biodegradables activas de formulación propia cuyas propiedades ópticas, mecánicas y de barrera han sido caracterizadas anteriormente (Capítulo 4) para envasar arándanos y conservarlos bajo condiciones de refrigeración. Con el propósito de estudiar el efecto de los envases activos, comparados con los de uso tradicional, sobre los principales parámetros de calidad comercial de la fruta y en el control de la podredumbre ocasionada por los géneros *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, se analizaron dichos atributos en frutos provenientes de dos cosechas consecutivas.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **5.2.1 Obtención de los envases activos biodegradables**

Para la formulación de los envases se utilizó quitosano en polvo (Q) de MPM y 85% de grado de desacetilación (Parafarm, Argentina); almidón de maíz (AM) (Glutal, Argentina), ácido acético glacial (99%, grado analítico); extracto de semillas de pomelo (ESP) (Euma S.A.I.C.I y F., Argentina) y aceite esencial de limón (AEL) (Litoral Citrus SRL, Argentina).

Las formulaciones se prepararon con la misma metodología que en el Capítulo 4, con la

incorporación de 3% de aceite esencial de limón (AEL3) o 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3). En este caso, se utilizaron moldes rectangulares de 10x15 cm<sup>2</sup> (Fig. 5.1) en la etapa de moldeo y deshidratación de las suspensiones filmogénicas. Para el armado de los envases, se tomaron dos películas y se termosellaron con una selladora de impulsos (Lepari, Argentina), como se describió previamente.

Asimismo, se usaron envases o cestas de PET, denominados comúnmente cestillas o *clamshells* (de 125 g o 4.4 oz de capacidad, con dimensiones de 106x106x40 mm<sup>3</sup>) y bolsas comerciales (DISEVAC SS MB Cristal 150x200, SENASA N° E-1163, Plásticos DISE S.A.) aptos para atmósfera modificada.



Figura 5.1: Separación de película biodegradable de almidón:quitosano (AM:Q) del molde de 10x15 cm<sup>2</sup>.

### 5.2.2 Estudio de conservación de arándanos

Con el objetivo de determinar los efectos de los envases formulados sobre los principales parámetros de calidad comercial de arándanos conservados bajo refrigeración, se realizaron dos ensayos sobre fruta proveniente de dos cosechas consecutivas.

En un primer ensayo, se utilizaron arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.), variedad Misty, provenientes de plantaciones de INTA Estación Experimental Concordia. La fruta fue cosechada en el mes de noviembre de 2016, con pH = 4.1; 14.6 °Brix y acidez = 0.10%; y se trasladaron a la Facultad de Ciencias de la Alimentación. Luego, se realizó la selección y clasificación de la fruta de acuerdo a su tamaño, forma y color, y se descartó la fruta con signos de daños mecánicos o alteración.

Los arándanos seleccionados fueron sometidos a 4 tratamientos, que se detallan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Aplicación de envases para conservación de arándanos correspondientes al ensayo 1.

Tratamiento	Descripción del envase
E1	Película biodegradable de AM:Q (75:25)
E2	Película activa biodegradable con 3% ESP
E3	Película activa biodegradable con 3% AEL
Testigo	<i>Clamshell</i>

AM: Almidón de maíz; Q: quitosano; ESP: extracto de semillas de pomelo;  
AEL: aceite esencial de limón

Todos los envases se llenaron con 25 arándanos cada uno (peso aproximado: 75 gramos), y luego se sellaron por el extremo abierto (Fig. 5.2). Se realizaron 4 réplicas para cada tratamiento.

Por cuestiones de disponibilidad de fruta, en el segundo ensayo, se trabajó con arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum* L.), variedad Emerald, cosechados en el mes de octubre de 2017, provenientes de plantaciones de la Región de Salto Grande. La fruta presentaba un grado de madurez óptimo (pH = 2.57; 13.5°Brix; acidez = 0.98%) y coloración azul en la mayor parte de la superficie de la fruta. Posteriormente se trasladaron a la Facultad de Ciencias de la Alimentación donde se seleccionaron por tamaño, forma y color, descartando la fruta dañada y/o alterada.

Las frutas ya seleccionadas se envasaron en distintos tipos de envases como se detalla en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Aplicación de envases para conservación de arándanos correspondientes al ensayo 2.

Tratamiento	Descripción del envase
E1	Película biodegradable de AM:Q (75:25)
E2	Película activa biodegradable con 3% ESP
E3	Película activa biodegradable con 3% AEL
E4	Bolsa comercial para AM
Testigo	<i>Clamshell</i>

AM: Almidón de maíz; Q: quitosano; ESP: extracto de semillas de pomelo;  
AEL: aceite esencial de limón; AM: atmósfera modificada



Todos los envases se llenaron con 25 frutas cada uno (peso aproximado: 55 g), y tanto las películas biodegradables como las bolsas comerciales para AM se sellaron por el extremo abierto (Fig. 5.2) al igual que en el ensayo anterior. En este caso, se realizaron 5 réplicas para cada tratamiento.



Figura 5.2: Procedimiento de envasado de arándanos frescos en películas activas.

(1) Llenado del envase, (2) Sellado del envase, (3) Envase conformado.

### 5.2.2.1 Almacenamiento de las muestras

En el primer ensayo, las muestras se almacenaron en cámara de refrigeración con temperatura y humedad relativa controladas a  $1 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y 85% HR (Harb & Streif, 2004; Defilippi y col., 2013), durante 24 días. En el segundo ensayo el período de almacenamiento fue de 30 días en cámara de refrigeración con temperatura y humedad relativa controladas a  $1 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y 90% HR, y luego, se mantuvieron 7 días a  $20^{\circ}\text{C}$  para simular además las condiciones de almacenamiento y las de comercialización. La diferencia en los tiempos de almacenamiento de ambos ensayos se debe a que los frutos utilizados en el primero se encontraban en el estadio correspondiente a fruta sobremadura mientras que los utilizados en el segundo presentaron grado de madurez óptimo. Además las diferencias en los pesos de los envases se debe a que se trabajó con arándanos de variedades diferentes.

Durante la conservación de las muestras en ambos ensayos se analizaron los atributos de calidad comercial de la fruta que se describen a continuación.

#### **5.2.2.2 Pérdidas de peso**

La deshidratación de los frutos durante el almacenamiento es uno de los principales problemas que afectan la calidad y que conlleva importantes pérdidas económicas. Por esta razón se determinó la pérdida de peso de las muestras durante la conservación en refrigeración en ambos ensayos y después de 7 días de almacenamiento a 20°C en el caso del segundo ensayo. Se utilizó una balanza OHAUS SP 602 (EEUU) y el resultado se expresó como porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial, se analizaron 4 réplicas en el caso del primer ensayo y 5 en el segundo.

#### **5.2.2.3 Firmeza**

Es sabido que las modificaciones que se producen en la pared celular de la fruta se traducen en cambios en la textura de ésta, haciéndola cada vez más blanda a medida que ocurre tanto el proceso de maduración como de senescencia. Instrumentalmente, este cambio en la textura se puede medir a través de ensayos de compresión o de punción de los frutos. Sin embargo, no existen métodos objetivos estandarizados para la medición de la textura en arándanos.

Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación Argentina el protocolo de calidad para arándanos frescos señala como requisito de *calidad diferenciada* que las bayas deben tener la condición de fruta firme al tacto (SAGPYA, 2015). Las metodologías existentes se basan en mediciones de la fuerza de punción, de penetración o de deformación de la fruta. En este trabajo de Tesis se eligió el método de punción mediante una sonda, también empleado por otros autores (Silva y col., 2005; Swift, 2010; Concha-Meyer y col., 2015).

En este caso, se determinó la firmeza de la fruta como la resistencia a la punción al inicio del ensayo y al finalizar el período de conservación, mediante un texturómetro (TA.XT2i Stable Micro System, Inglaterra) con una sonda cilíndrica de 2 mm (P/2) a una velocidad de 1.0 mm/s.

La fruta se colocó de tal forma que sea penetrada en la zona ecuatorial (Fig. 5.3).

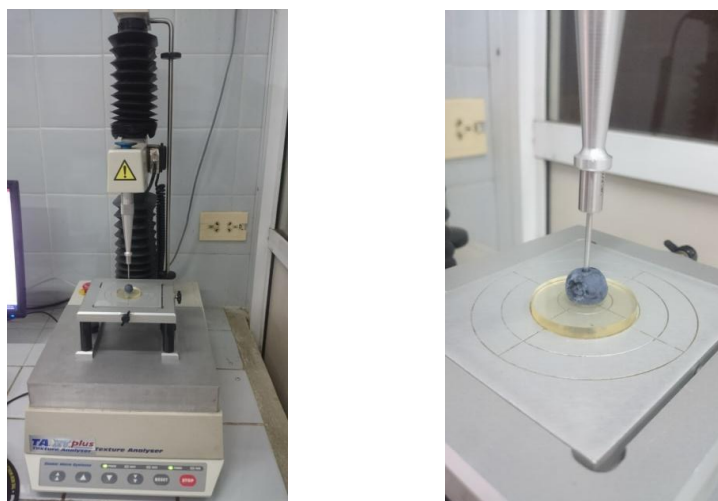


Figura 5.3: Determinación de resistencia a la punción de arándanos frescos.

Las determinaciones se efectuaron durante la conservación en refrigeración y el almacenamiento a 20°C (en el caso del segundo ensayo), tomando 30 arándanos al azar, para cada tratamiento.

En la Fig. 5.4 se muestra un perfil de fuerza vs distancia típico obtenido en un ensayo de punción. En esta curva se observa inicialmente un rápido ascenso de la fuerza, en esta etapa, la fruta se deforma por acción de la fuerza aplicada pero la sonda no penetra los tejidos. La fuerza máxima corresponde a la fuerza necesaria para penetrar el fruto y se conoce como punto de ruptura (Zapata y col., 2010). Luego, cuando se perfora la piel, la fuerza desciende marcadamente, lo cual demuestra que la pulpa es más blanda que la piel.

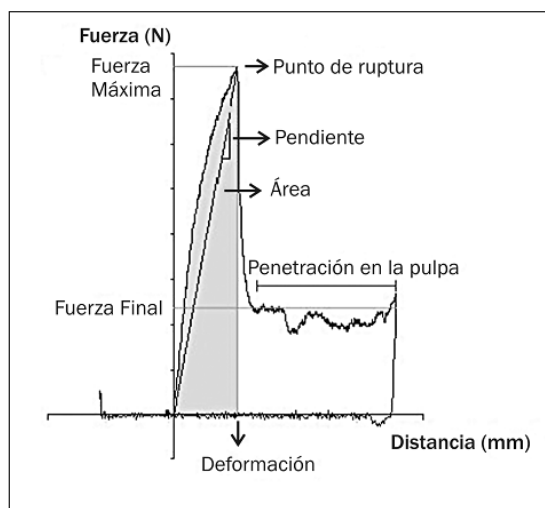


Figura 5.4: Perfil de comportamiento mecánico típico y parámetros para arándanos obtenido mediante ensayo de punción (Adaptado de Zapata y col., 2010).

#### 5.2.2.4 Tasa respiratoria

Los arándanos se consideran como frutos climatéricos en los cuales se produce un aumento de la tasa respiratoria y de la producción de etileno durante su madurez y senescencia. Sin embargo, a diferencia de otros frutos climatéricos, deben ser cosechados cercanos a su madurez de consumo, ya que los atributos organolépticos como el sabor, no mejoran después de la cosecha. La tasa respiratoria depende de la temperatura, y aumenta notablemente con el aumento de la temperatura de conservación de los arándanos (Defilippi y col., 2013).

Esta fruta presenta dos incrementos de la tasa respiratoria durante su desarrollo; inicialmente con el comienzo de la coloración en donde ocurre una transición del verde-rosado a un estado azul-rosado y luego cuando comienza la sobremaduración (Preedy, 2015).

La tasa respiratoria de la fruta se determinó mediante un método estacionario colocando 120 g de fruta en un recipiente de vidrio de 1.5 L de capacidad. Éste se cerró herméticamente y se conectó mediante un septo a un medidor de gases CheckMate 3 Dansensor (Dinamarca) (Fig. 5.5). El equipo cuenta con un sensor de circonio (Zr) para medición de O<sub>2</sub> y un sensor de CO<sub>2</sub> del tipo de infrarrojo no dispersivo. La concentración de gases dentro de los frascos de vidrio se midió cada 1 hora durante 8 horas, a 25°C. Las determinaciones se realizaron por duplicado, para cada tratamiento.



Figura 5.5: Determinación de tasa respiratoria estacionaria en arándanos.

A partir de los datos obtenidos con el equipo se graficaron los porcentajes de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub> en función del tiempo. Los datos se regresionaron linealmente y de la pendiente de la recta de ajuste, se calculó la tasa respiratoria en mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, en términos de CO<sub>2</sub>

producido y O<sub>2</sub> consumido (Fonseca y col., 2002), de acuerdo a las ecuaciones (5.1) y (5.2). Además se determinó el cociente respiratorio (CR) como la proporción de CO<sub>2</sub> producido por O<sub>2</sub> consumido por el producto.

Estos ensayos se realizaron al momento inicial y al finalizar el período de conservación de las muestras.

$$RO_2 = \frac{V_{aire} \times m_{O_2}}{m_{fruta} \times 100} \quad (5.1)$$

$$RCO_2 = \frac{V_{aire} \times m_{CO_2}}{m_{fruta} \times 100} \quad (5.2)$$

Donde  $m_{O_2}$  y  $m_{CO_2}$  son las pendientes de las rectas de ajuste de los datos de porcentaje de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub> en función del tiempo (h), respectivamente.

#### 5.2.2.5 Calidad interna

La acidez se midió por titulación potenciométrica a pH 8.3 aplicando el método 942.15 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). Se utilizó un pHmetro (Hanna, Rumania). Como los arándanos se caracterizan por tener altos contenidos de ácido cítrico y succínico (del 75 y 17%, respectivamente), la acidez se expresa como contenido de ácido cítrico por cada 100 g de fruta (% o g ácido cítrico por 100 g fruta).

Los sólidos solubles medidos en °Brix, se determinaron mediante el método refractométrico (AOAC 15TH 983.17–976.20, 1990), utilizando un refractómetro tipo Abbe digital, con compensador de temperatura (Misco, E.E.U.U.)

Se analizaron, por tratamiento, 3 muestras de 5 gramos de jugo obtenidos de la trituración y filtrado de 25 frutas. Las determinaciones se realizaron al inicio, a la salida de la conservación en frío y después del período de almacenamiento a 20°C.

#### 5.2.2.6 Color superficial

La coloración superficial de los arándanos es uno de los parámetros de calidad comercial que determina la aceptación por parte del consumidor siendo deseable que la fruta presente una coloración azul homogénea en toda su superficie (Defilippi y col., 2013; SAGPYA, 2015). El color de la epidermis va variando a medida que madura el fruto y se intensifica hacia el final de la maduración (Godoy, 2004).

El color superficial de los arándanos se determinó realizando tres mediciones por fruto y evaluando 25 frutos por muestra, con un colorímetro Minolta CR-300 (Japón) con iluminante D65, en la escala de color CIELab. El valor de L representa la luminosidad y varía desde 0 (negro) a 100 (blanco); el parámetro  $a^*$  indica color verde (-) a rojo (+), mientras que  $b^*$  varía desde el azul (-) al amarillo (+). Las determinaciones se realizaron al inicio y al finalizar el período de conservación.

#### 5.2.2.7 Actividad antioxidante

Es sabido que los arándanos son valorados nutricionalmente por su elevado contenido de antioxidantes (Prior & Wu., 2013). Los compuestos antioxidantes intervienen en la protección de los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos contra el proceso oxidativo iniciado por radicales libres (Howart y col., 2003). Así, con el fin de evaluar las pérdidas de estos compuestos durante el almacenamiento de los frutos se determinó la actividad antioxidante de los arándanos a tiempo inicial y final mediante la técnica de ABTS; además el análisis se completó evaluando el contenido de compuestos fenólicos totales por la técnica de Folin-Cioalteau.

En primer lugar se prepararon extractos etanólicos: el tejido de pulpa congelado con nitrógeno líquido se molió a polvo en un molinillo (Ultracomb 8100a, Argentina). Luego se pesaron aproximadamente 0.1 gramos de muestra y se diluyeron a 5 mL de etanol (Porta, Argentina). La suspensión se agitó en vórtex y se centrifugó a 12000g durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Rolco 2036 (Rolco, Argentina).

Para la cuantificación del contenido de antioxidantes se preparó una solución con 0.0192 gramos del reactivo ABTS ( $PM = 548.68 \text{ g mol}^{-1}$ ) y 0.0033 gramos de  $K_2S_2O_8$  ( $PM = 270 \text{ g mol}^{-1}$ ) para obtener concentraciones finales de 7 mM de ABTS y 2.45 mM de  $K_2S_2O_8$ . 5 mL de esta solución se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas, sin agitación, para favorecer la formación del radical  $ABTS^{*\cdot}$ . Una vez transcurrido este tiempo, se toma una alícuota de la solución y se diluye con etanol de manera de obtener una absorbancia de  $0.7 \pm 0.05$  a 734 nm.

Posteriormente se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de los extractos etanólicos de las muestras y 1 mL de la solución del radical  $ABTS^{*\cdot}$  preparada anteriormente, bajo agitación constante, y luego de 6 min se mide la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro (UV-Mini Hitachi, Estados Unidos). Como blanco se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de etanol con 1 mL de la solución de  $ABTS^{*\cdot}$ . Para que las mediciones sean válidas, el porcentaje de reducción

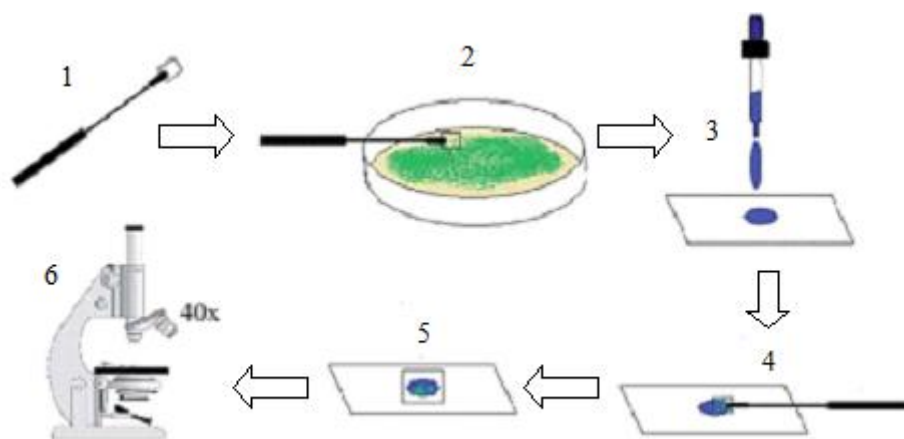
de la absorbancia debe encontrarse entre el 20 y el 80% respecto al blanco. La curva de calibración se realizó con el reactivo Trolox (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), un análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -tocoferol, como estándar. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado utilizando extractos independientes. Los resultados se expresaron como Capacidad antioxidante equivalente del trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) por peso fresco en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Asimismo se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. Se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de los extractos etanólicos de tejido fresco en tubos con agua destilada (hasta completar 1350  $\mu\text{L}$ ) y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de 1  $\text{eq L}^{-1}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), que es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato. Las muestras se homogeneizaron en un vortex y después de 3 minutos a 20 °C, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (p / v) en 0.1  $\text{eq L}^{-1}$  de NaOH. Los tubos se homogeneizaron en vórtex nuevamente y se incubaron a 20 °C durante 1 hora al resguardo de la luz. Se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (UV Mini-1240, Shimadzu Corporation, Japón). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) utilizando una solución estándar de 224  $\mu\text{g/mL}$ , dado que este es el compuesto fenólico predominante en arándanos. Las muestras se midieron al menos por triplicado utilizando extractos independientes. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido clorogénico por kilogramo de peso fresco ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

#### **5.2.2.8 Deterioro fúngico**

Se realizó la observación macroscópica de la infección poscosecha de la fruta a la salida del almacenamiento en frío. Se contabilizó como positiva la podredumbre desde el primer punto de infección visible y el resultado se expresó como porcentaje de deterioro.

Posteriormente, los mohos predominantes se observaron en Microscopio Óptico (Leica DME, Estados Unidos), mediante tinción con azul de algodón de lactofenol (Fig. 5.6).



1. Colocar un segmento de cinta adhesiva de 1 cm<sup>2</sup> en un anso
2. Tocar la parte superior del hongo con la parte adhesiva de la cinta
3. Colocar 1 gota del colorante en un portaobjetos
4. Colocar la cinta sobre la gota de azul de algodón, y colocar otra gota del colorante
5. Poner un cubreobjetos sobre la preparación
6. Observar en 40x

Figura 5.6: Preparación de muestras para la observación de hongos filamentosos.

### 5.2.2.9 Características organolépticas

Las características organolépticas de las muestras fueron determinadas por el personal del laboratorio, al final el período de conservación. Esto se realizó utilizando una escala hedónica de 3 puntos para los atributos de aspecto, textura y aroma.

### 5.2.3 Ensayos mediante Inoculación artificial

Con el fin de evaluar la gravedad de la enfermedad como una expresión de resistencia inducible, se efectuaron inoculaciones artificiales en arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum* L.), variedad Misty cosechada en el mes de octubre de 2017, provenientes de plantaciones de INTA Estación Experimental Concordia.

Para la inoculación se utilizaron cepas monospóricas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* que fueron aislados de fruta deteriorada por dichos mohos, proveniente de plantaciones de la Región de Salto Grande. Estas cepas fueron provistas por la Dra. Micaela Heredia del cepario del laboratorio LAMAS de la Facultad de Ciencias de la Alimentación.

#### 5.2.3.1 Metodología de Inoculación

Para cada moho, el inóculo consistió en una suspensión acuosa de 10<sup>5</sup> esporos mL<sup>-1</sup> provenientes de cultivos de 12 días de crecimiento dispersados asepticamente en 10 mL



de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1% (v/v). Los esporos se contabilizaron en cámara de Newbauer.

La metodología empleada se adaptó de lo realizado por Huang & Chen (2014). La fruta se trató con UV cercano (240 nm) en una campana de bioseguridad ESCO Airstream® Gen 3 (Singapur) durante 10 min para reducir la micoflora naturalmente presente. Luego, considerando que las infecciones que resultan en las podredumbres poscosecha típicamente ocurren a través de la cicatriz del pedúnculo, cada una de las bayas se inoculó en esta zona con 50  $\mu$ L de la suspensión de esporos (Fig. 5.7). Una vez inoculadas las frutas, se dejaron secar durante 15 minutos en la campana de bioseguridad.



Figura 5.7: Inoculación de arándanos en el pedúnculo con suspensión de esporos de *Botrytis cinérea*.

### 5.2.3.2 Preparación y almacenamiento de las muestras

Las frutas inoculadas se envasaron en las películas activas biodegradables desarrolladas cuya nomenclatura es: AM:Q, ESP3 y AEL3; en los envases comerciales utilizados como testigo (*clamshell*, CL) y en bolsas de atmosfera modificada (AM) (Fig. 5.8).

Todos los envases, conteniendo 25 bayas, se sellaron mediante selladora de impulsos (Lipari, Argentina) y se colocaron en cámaras húmedas, constituidas por cajas herméticas, durante 9 días a la temperatura óptima para el desarrollo de enfermedades ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Dentro de cada cámara húmeda, había cinco réplicas de cada envase.



Figura 5.8: Envasado de arándanos inoculados en películas biodegradables.

### 5.3.2.3 Evaluación del deterioro y la gravedad de la enfermedad

Al finalizar el almacenamiento en cámara húmeda se contabilizaron las bayas con podredumbres, desde el primer punto de infección visible. El resultado se expresó en porcentaje de incidencia de infección fúngica respecto al total de frutos por envase.

La gravedad de la enfermedad se registró de acuerdo con una escala empírica con seis grados: 0, fruta saludable; 1, 1% a 20% de superficie de fruta infectada; 2, 21% a 40% de superficie de fruta infectada; 3, 41% a 60% de superficie de fruta infectada; 4, 61% hasta el 80% de la superficie de la fruta infectada; 5, >81% de la superficie de la fruta infectada y mostrando esporulación (Servili y col., 2017). Esta escala empírica permitió el cálculo del índice de McKinney, que expresa el promedio ponderado de la severidad de la putrefacción como un porcentaje del posible nivel máximo de la enfermedad (100%); el mismo se calculó de acuerdo con la Ecuación 5.3.

$$I = [\sum(d \times f) / (N \times D)] \times 100 \quad (5.3)$$

Donde  $d$  es la categoría de intensidad de podredumbre anotada en la baya,  $f$  es su frecuencia,  $N$  es el número total de bayas examinadas (es decir, sanas y podridas), y  $D$  es la categoría más alta de intensidad de la enfermedad que puede ocurrir en la escala empírica (Servili y col., 2017).

Por otra parte, se calculó la severidad de la podredumbre (1 a 5) como el promedio ponderado del grado de deterioro.

### 5.2.4 Análisis estadístico

El análisis de los datos ha sido realizado con el programa STATGRAPHICS PLUS, versión 5.1, mediante el análisis de varianza (ANOVA) analizando la diferencia mínima entre las medias mediante el test Fisher. En todos los casos, se trabajó con un nivel de confianza del 95%.

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Estudios de conservación de arándanos

#### 5.3.1.1 Calidad interna

Con respecto a la evolución en el grado de madurez de la fruta, en el primer ensayo con arándanos variedad Misty, se observó que no hubo diferencia significativa entre el contenido de sólidos solubles del inicio (14.6°Brix), y al finalizar la conservación en los arándanos en el envase comercial *clamshell* CL (15.2°Brix) y con las películas biodegradables AM:Q (15.2°Brix). Ambas muestras también mostraron mantener la acidez a la salida de la refrigeración, lo que indicaría que el envase biodegradable retardó la senescencia de los frutos. En cuanto a la fruta envasada con películas activas, ESP3 y AEL3, hubo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los sólidos solubles y una disminución de la acidez. (Fig. 5.9) indicativo de que la atmósfera generada dentro de los envases activos afectó el desarrollo de estos parámetros fisiológicos.

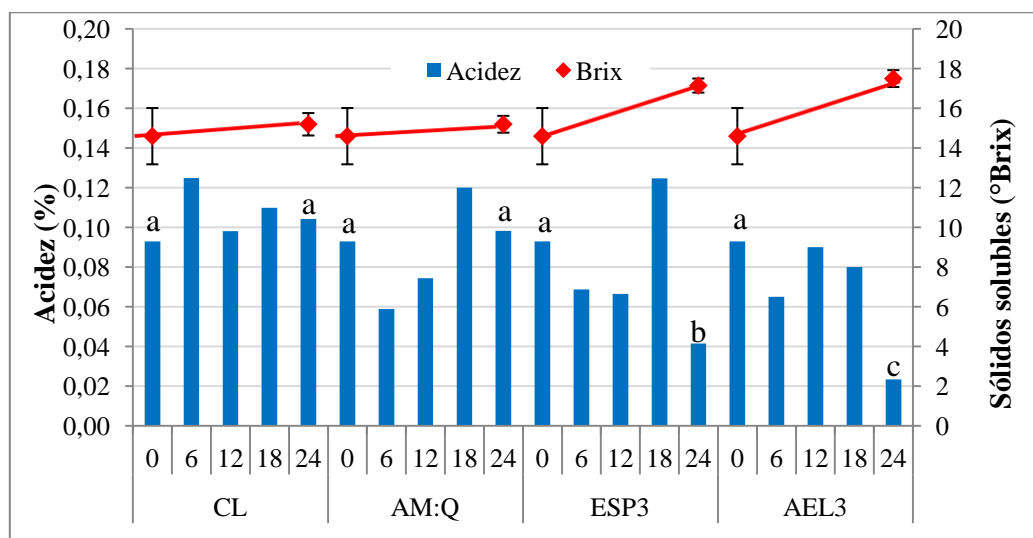


Figura 5.9: Contenido de sólidos solubles y acidez en arándanos var. Misty durante almacenamiento refrigerado envasados en *clamshell* (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

En el segundo ensayo los arándanos variedad Emerald envasados en AM:Q, ESP3 y AEL3 mantuvieron el índice de madurez, que se estima como la relación entre el contenido de sólidos solubles (SS) y la acidez titulable de los frutos, durante el período de conservación bajo refrigeración ya que no se encontró variación significativa ( $p > 0.05$ ) en los SS y en la acidez. En cuanto a la fruta envasada en los envases comerciales: *clamshell* (CL) y film comercial para atmósfera modificada (AM) se observó una disminución significativa de la acidez (Fig. 5.10).

Cabe aclarar que las diferencias observadas respecto al primer ensayo se atribuyen no sólo a que, por razones de disponibilidad de fruta, se trabajó con variedades de arándanos diferentes sino también a las diferencias en el estadio de madurez de los frutos al momento de la cosecha.

Durante el período de almacenamiento a temperatura ambiente (indicado en la Fig. 5.10 como 37) todas las muestras aumentaron el índice de madurez al bajar la acidez de la fruta, sin embargo AM:Q, ESP3, AEL3 y AM tuvieron una acidez significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la fruta envasada en CL indicando que tanto los envases biodegradables como los activos y el film comercial permitieron retardar la senescencia de los frutos.

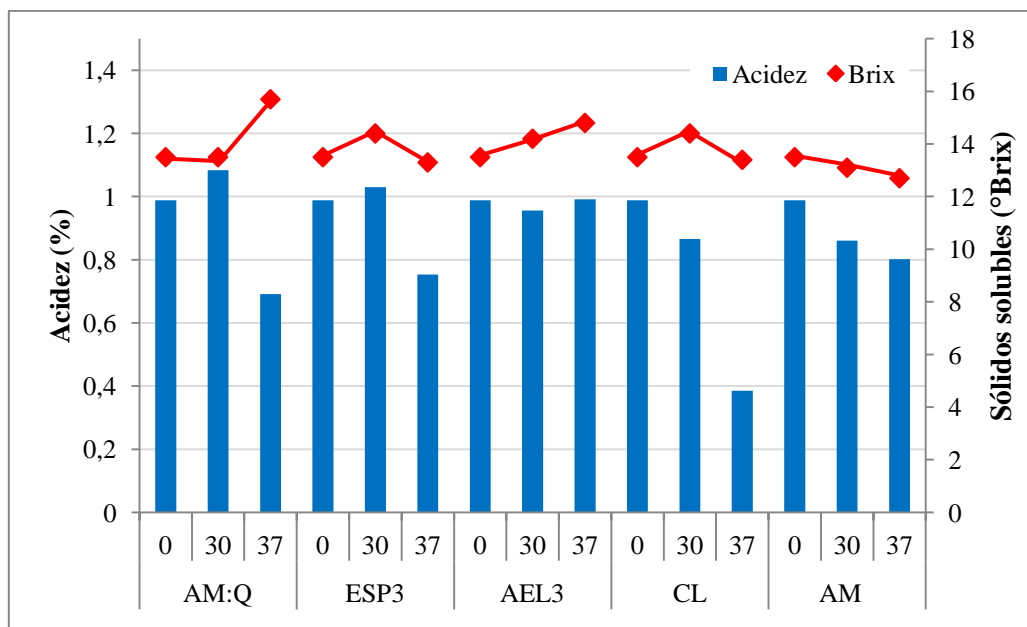


Figura 5.10: Contenido de sólidos solubles y acidez en arándanos var. Emerald durante almacenamiento 30d refrigerado y 7d a temperatura ambiente envasados en *clamshell* (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

La disminución en la acidez con el aumento de la temperatura de almacenamiento, se debe, probablemente, al consumo de ácidos orgánicos como sustratos de la respiración de la fruta. Resultados similares fueron informados por Harb y Streif (2004) así como por Almenar y col. (2008). Esto se corresponde con los resultados obtenidos en la tasa respiratoria de la fruta; al aumentar la temperatura de almacenamiento, se incrementó la tasa respiratoria con el consecuente aumento de la madurez.

### **5.3.1.2 Pérdida de peso**

En la Fig. 5.11 se muestran las pérdidas de peso para arándanos (variedad Misty) del primer ensayo durante su conservación en refrigeración. Se puede observar que las pérdidas de peso fueron mayores para las películas con AEL que para el resto de las muestras, y estos valores se mantuvieron elevados durante todo el ensayo. La fruta envasada en estas películas se encontraba visiblemente deshidratada y marchita. Estos resultados se correlacionan con la microestructura de las películas activas conteniendo AEL como se discutió en el Capítulo 4 y su impacto en las propiedades de barrera al vapor de agua, las que en definitiva condicionan la pérdida de peso de los frutos.

La fruta con mayor deshidratación a la salida del almacenamiento refrigerado ( $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 85%HR), fue la contenida en el envase AEL3 (15%), en tanto que la pérdida de peso significativamente menor ( $p < 0.05$ ) la presentó la fruta envasada en ESP3 (8.8%). Los arándanos en envases AM:Q y CL resultaron similares con una pérdida de peso aproximada de 10%.

Forney (2008) informó que el almacenamiento en condiciones de humedades relativas elevadas (95% o más) minimiza las pérdidas de peso y el marchitamiento de arándanos. Sin embargo, esto puede favorecer el crecimiento de mohos si no se controla la condensación (Sargent y col., 2006).

De acuerdo con la literatura, las máximas pérdidas de peso de los arándanos antes de que pierdan su calidad comercial se encuentran entre 5 y 8% (Nunes y col., 2004; Almenar y col., 2008), ya que se origina deshidratación y arrugamiento superficial por lo que la fruta queda con poca apariencia atractiva (Figueroa y col., 2010). De acuerdo con Salunkhe y col. (1991) este marchitamiento es el resultado de la plasmólisis celular que se manifiesta cuando las frutas pierden contenidos de humedad mayores al 5 - 10%.

Así, considerando sólo este parámetro y un valor límite de aceptabilidad del 8%, la vida útil de los frutos envasados sería de 18 días para todas las formulaciones excepto los envases conteniendo AEL, en cuyo caso se reduciría a 12 días.

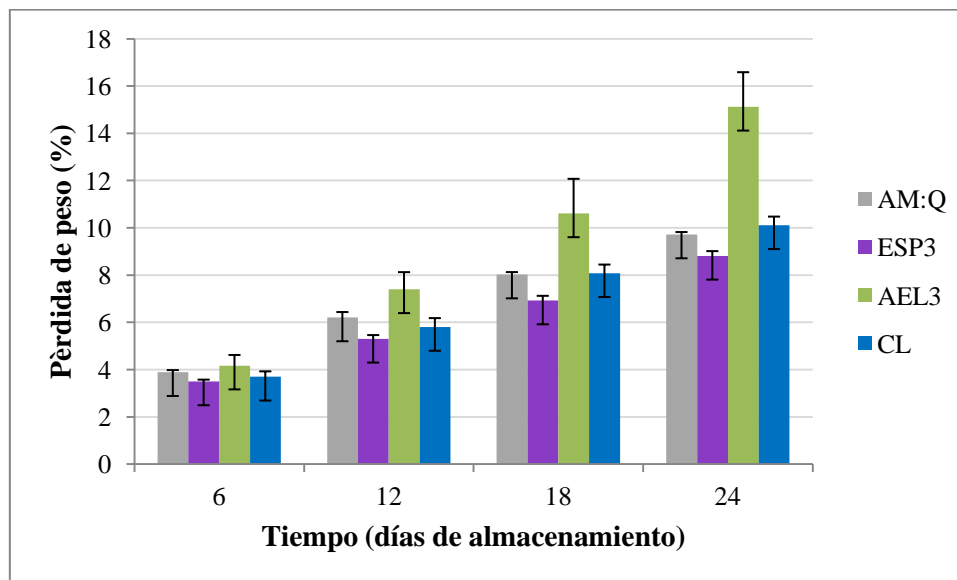


Figura 5.11: Pérdidas de peso para arándanos var. Misty durante 24 d en almacenamiento refrigerado envasados en *clamshell* (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).

Las pérdidas de peso en el segundo ensayo para arándanos var. Emerald pueden observarse en la Fig. 5.12. Durante el período de almacenamiento refrigerado, la menor pérdida de peso se observó en la fruta contenida en AM como se esperaba considerando que las pérdidas de peso en frutas están directamente relacionadas con la tasa respiratoria (Jackson y col., 1999) y con la permeabilidad a los gases del film sintético. Una atmósfera con baja concentración de O<sub>2</sub> y rica en CO<sub>2</sub> puede reducir la tasa respiratoria como así también disminuir la producción de etileno, la oxidación y el deterioro de la fruta. Concha-Meyer y col. (2015) encontraron valores similares de pérdidas de peso para arándanos conservados en atmósferas modificadas.

Durante el período de almacenamiento refrigerado, las muestras AM:Q y ESP3 presentaron menores pérdidas de peso que el control (*clamshell*, CL) ( $p < 0.05$ ). En cambio, las muestras envasadas en películas activas AEL3 tuvieron pérdidas de peso similares al control no resultando ser barreras eficientes al vapor de agua.

A la salida del almacenamiento en frío (30 días), las bayas envasadas en ESP3 y en AM:Q evidenciaron una pérdida de peso significativamente ( $p < 0.05$ ) menor que las contenidas en el envase testigo (*clamshell*, CL), indicando la eficiencia de los envases biodegradables. Sin embargo, y como ya se mencionó, las muestras AEL3 tuvieron pérdidas de peso mayores al CL.

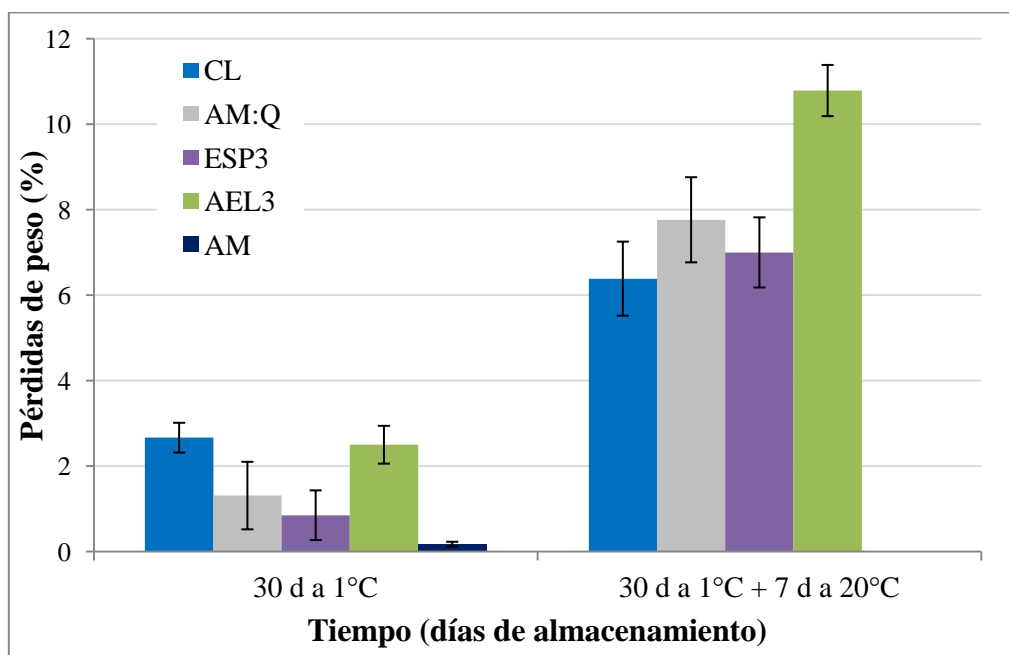


Figura 5.12: Pérdidas de peso para arándanos var. Emerald durante 30 d de almacenamiento refrigerado y 7 d a temperatura ambiente envasados en *clamshell* (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

De la misma forma que en el primer ensayo, considerando sólo este parámetro y un valor límite de aceptabilidad del 8%, la vida útil de los frutos envasados sería aceptable luego de 30 días de almacenamiento en todos los casos. Sin embargo, simulando el abuso térmico que se produciría en los puntos de comercialización (30 días a 1°C y 7 días a 20°C) todas las formulaciones excepto los envases conteniendo AEL cumplirían con este criterio de calidad.

Estos resultados son relevantes ya que indican que estos envases biodegradables podrían utilizarse para la exportación de arándanos y su transporte en condiciones de refrigeración.

### 5.3.1.3 Firmeza

Los resultados de la firmeza de arándanos variedad Misty (primer ensayo), se encuentran en la Fig. 5.13. Como puede observarse, la resistencia de la fruta a la punción disminuyó hacia el final del período de almacenamiento, tanto para las muestras ESP3, AEL3 y el envase comercial (CL), pero esta disminución no fue significativa ( $p > 0.05$ ). A diferencia de esto, la fruta envasada en AM:Q mantuvo sus características de resistencia mecánica durante todo el ensayo, resultados que se correlacionan con la menor pérdida de peso de los frutos envasados con estas películas.

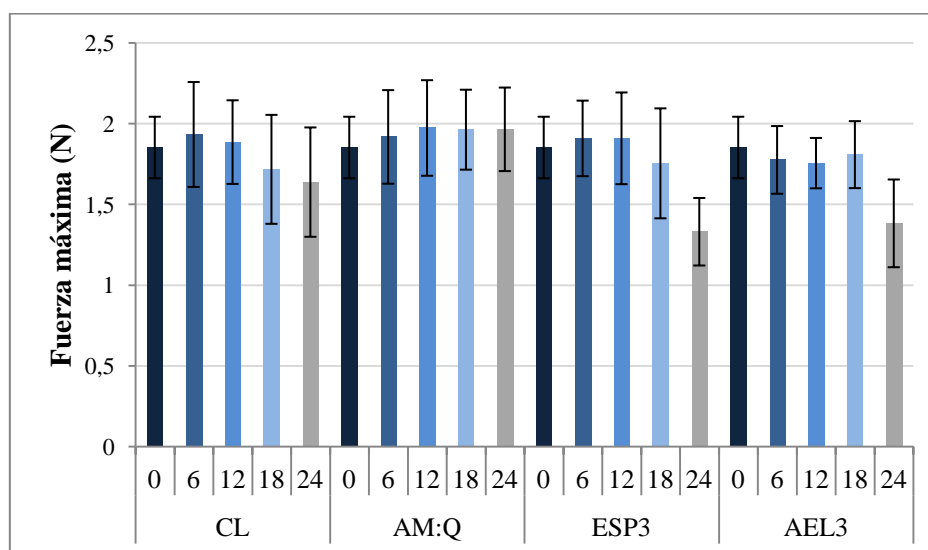


Figura 5.13: Evolución de la fuerza máxima durante la conservación de arándanos var. Misty envasados en *clamshell* (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

La textura se ve afectada por los orgánulos celulares, los componentes bioquímicos, el contenido de agua o la turgencia y la composición de la pared celular de las células de las frutas. Se ha informado que durante la maduración de los arándanos, la pectina hidrosoluble total disminuye y la degradación de la pared celular y la laminilla media es responsable de la pérdida de firmeza (Deng y col., 2005). Asimismo, durante el crecimiento y desarrollo de los frutos ocurren cambios en la química de los componentes celulósicos de la pared celular, pectinas y hemicelulosas que también pueden afectar la textura (Chiabrando, 2009). Además, las variaciones observadas en la



evolución de este atributo de calidad pueden atribuirse a los diferentes cultivos y/o su interacción con las condiciones de almacenamiento poscosecha.

Para la variedad Emerald (segundo ensayo), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la firmeza de las bayas en todas las muestras (Fig. 5.14), es decir, que la fruta mantuvo sus características físicas durante el período de conservación a  $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 90%HR y  $20^\circ\text{C}$ . Más aún, no se registró una modificación importante en la firmeza durante el abuso térmico (indicado como 37 en la Fig. 5.14).

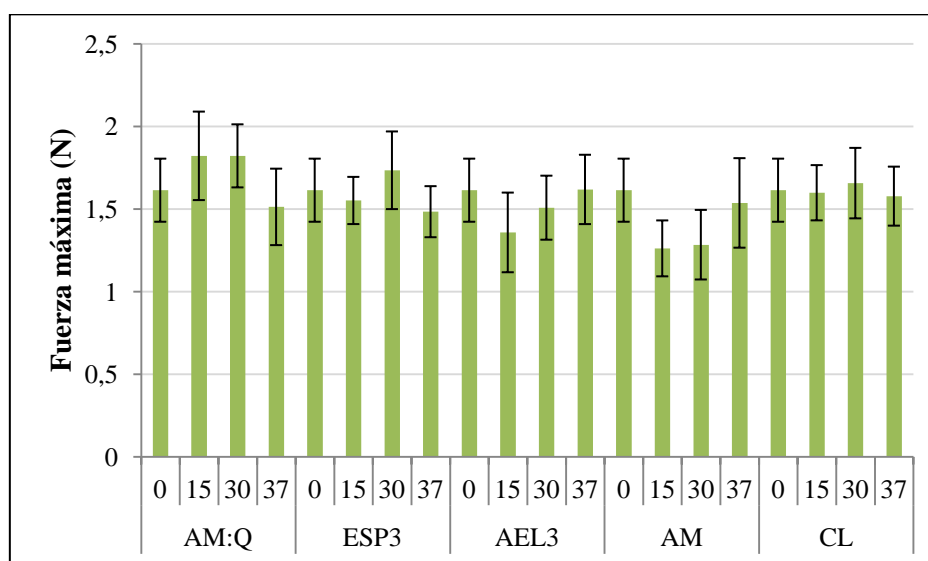


Figura 5.14: Evolución de la fuerza máxima durante la conservación de arándanos var. Emerald envasados en *clamshell* (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

La ausencia de cambios significativos en la firmeza de ambas variedades durante el almacenamiento se corresponde con los resultados obtenidos por Chiabrando y col. (2009) y Concha-Meyer y col. (2015) quienes encontraron que durante el almacenamiento, la firmeza de arándanos no fue un factor de calidad crítico. Las condiciones de bajas temperaturas podrían retardar el ablandamiento de la fruta inhibiendo la actividad enzimática y la producción de etileno (Concha-Meyer, 2015).

La variabilidad entre los resultados de la fuerza máxima de penetración para ambas variedades puede deberse a diferencias de tamaño de los arándanos en las distintas muestras. Los arándanos más pequeños tienden a ser un poco más firmes que los de

mayor tamaño, dando una relación inversamente proporcional entre tamaño y firmeza para una misma variedad (Smagula y col., 1997; Khazaei & Mann, 2004). Asimismo, Chiabrando y col. (2011) y Døving & Måge (2002) también reportaron gran variabilidad en la firmeza entre diferentes variedades de arándanos.

El aumento de la firmeza en las muestras AEL3 a partir de los 15 días, podría deberse a la pérdida de humedad durante el almacenamiento, lo cual produce bayas menos turgentes (Fava y col., 2006; Mahajan & Goswami, 2004). Entonces durante el ensayo de punción cuando la sonda ejerce presión en la fruta, los tejidos son más plásticos o gomosos, deformándose más antes de que se supere la tensión superficial y se produzca la ruptura irreversible (Giongo y col., 2013).

#### **5.3.1.4 Tasa respiratoria**

La temperatura tiene una relación directa con el metabolismo de la fruta y con la vida en poscosecha. Durante la cosecha los frutos se encuentran en general bajo condiciones de alta temperatura ambiente, lo que hace que se encuentren respirando a una alta tasa. En el proceso de respiración se consume oxígeno ( $O_2$ ) y se produce dióxido de carbono ( $CO_2$ ) para poder producir energía necesaria para mantener la vida; sin embargo, como subproductos existe calor de respiración y agua liberados al medio. La respiración y sobre todo aumentos en su tasa pueden afectar la calidad de la fruta, por ejemplo producto del calor de respiración que aumenta la temperatura, se produce pérdida de agua en el proceso y además es posible observar en muchos casos una baja de la acidez porque los ácidos son usados como sustratos preferenciales para el proceso de respiración.

En el interior de los envases de películas activas y en el obtenido con film sintético para atmósfera modificada (AM), se genera una atmósfera modificada de equilibrio debido a la actividad respiratoria de los arándanos envasados y a la permeabilidad del material de empaque. En cambio, en los envases comerciales que habitualmente se utilizan, *clamshells*, no se daría este equilibrio debido a la ventilación que poseen estos envases.

En el ensayo con arándanos var Misty al inicio se observó una generación alta de  $CO_2$ . En general, los arándanos contenidos en los envases ensayados, excepto en ESP3, presentaron una disminución hacia el final del período de almacenamiento como resultado del efecto ralentizador del frío en el metabolismo de la fruta (Tabla 5.3). En el caso de la fruta envasada con películas activas conteniendo ESP3, los elevados valores observados en la composición gaseosa de la atmósfera interna llaman la atención ya que

si bien se trabajó con fruta en estadio sobremaduro las películas activas con ESP3 no presentaron propiedades de barrera a los gases diferenciales de las AM:Q, como se discutió en el Capítulo 4.

El cociente respiratorio (CR) es la proporción de CO<sub>2</sub> producido por O<sub>2</sub> consumido por el producto y su valor oscila entre 0.7-1.3 en la respiración aeróbica dependiendo del sustrato metabólico (Kader y col., 1989; Iqba y col., 2009). Beaudry y col. (1992) informaron que normalmente los arándanos presentan cocientes respiratorios de 1.3 debido al alto contenido de ácido cítrico y de azúcares. Así de acuerdo a este criterio los frutos envasados con películas ESP3 presentaron condiciones de respiración anaeróbica. Los valores del CR de los testigos envasados en *clamshells* se encuentran en el límite de aceptabilidad para este criterio.

Tabla 5.3: Tasa respiratoria y cociente respiratorio a 25°C de arándanos variedad Misty recién cosechados (inicial) y luego de finalizar el período de almacenamiento refrigerado.

		RCO <sub>2</sub>	RO <sub>2</sub>	CR
		mL kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mL kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
24 d a 1°C y 85% HR	Inicial	21.49	21.79	0.99
	AM:Q	17.59	15.39	1.14
	ESP3	222.63	128.57	1.73
	AEL3	15.62	19.32	0.81
	Testigo	16.92	12.47	1.35
	<i>clamshell</i>			

En la Tabla 5.4 se presenta la evolución de la tasa respiratoria de arándanos de la variedad Emerald. Los valores reportados son menores que los correspondientes al primer ensayo (Tabla 5.3) debido no sólo a que se trabajó con variedades diferentes, por razones de disponibilidad, sino también con estadios de madurez inicial diferentes.

Todos los envases resultaron efectivos para controlar la tasa respiratoria de los frutos durante el almacenamiento refrigerado.

Como era de esperar la menor variación en el Cociente respiratorio (CR) se obtuvo para los films sintéticos con probada capacidad de barrera diferencial a los gases (película AM, Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Tasa respiratoria a 25°C de arándanos variedad Emerald recién cosechados (inicial) y luego de finalizar el período de almacenamiento refrigerado.

		RCO <sub>2</sub>	RO <sub>2</sub>	CR
		mL kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mL kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	
30 d a 1°C y 90% HR + 7 d a 20°C	Inicial	1.31	1.05	1.25
	AM:Q	6.30	6.06	1.04
	ESP3	12.87	12.98	0.99
	AEL3	5.84	4.96	1.18
	Testigo <i>clamshell</i>	2.82	2.09	1.35
	AM	3.19	4.66	0.68

De las películas biodegradables desarrolladas en el presente trabajo de Tesis, los menores CRs se obtuvieron con el envase biodegradable AM:Q y con el envase activo ESP3 y se puede inferir que serían materiales con propiedades de barrera adecuadas para la conservación de los arándanos puesto que mostraron tener la menor pérdida de peso en el almacenamiento refrigerado (Fig. 5.11) y un buen control de los parámetros fisiológicos de madurez (Fig. 5.9)

En la literatura se ha informado el uso de envases biodegradables y de recubrimientos comestibles a base de diferentes biopolímeros conteniendo compuestos activos para la conservación de frutas. Al respecto, Perdonés y col. (2012, 2016) estudió el comportamiento de frutillas recubiertas con quitosano y aceite esencial de limón. Estos autores encontraron que el aceite de limón afectó el metabolismo de las frutillas modificando los patrones de respiración de la fruta. El CR también aumentó y se detectaron compuestos volátiles en la fruta, relacionados al metabolismo fermentativo (acetaldehído y etanol) indicando condiciones de anaerobiosis. Estas modificaciones fueron atribuidas por los autores a interacciones de las células con el quitosano o el aceite esencial que indujeron stress celular y cambios en la actividad enzimática del fruto.

Por otra parte, Almenar y col. (2008) encontraron que en arándanos envasados en contenedores biodegradables de PLA (ácido poliláctico), se alcanza una condición de equilibrio en el espacio de cabeza, a los tres días de almacenamiento. Estos autores

también encontraron que la composición de gases dentro de los envases depende de la temperatura de almacenamiento.

Asimismo, Giuggioli y col. (2017) trabajaron con arándanos envasados en films biodegradables y observaron que la variación en la tasa respiratoria durante 16 días de almacenamiento refrigerado fue pequeña, pero, al exponer los envases a temperatura ambiente, las diferencias en la tasa respiratoria entre tratamientos fueron significativas.

### **5.3.1.5 Color superficial**

Las antocianinas localizadas en la piel y la pulpa son las responsables de la coloración azul de la fruta, siendo el principal pigmento la malvidina. El color de la piel es utilizado como un indicador de cosecha, y una vez alcanzado el estado completamente azul, el color no cambia, en cambio sí lo hacen la acidez, los sólidos solubles y el pH (Giacalone, 2002).

Respecto de los parámetros de coloración superficial se ha informado que los valores de luminosidad (L) y del parámetro de cromaticidad ( $b^*$ ) pueden ser afectados por la capa natural cerosa que recubre la superficie de las bayas conocida como *bloom* (Saftner y col., 2008; Wisuthiphaet y col., 2014).

Los resultados de la evolución del color superficial obtenidos en los dos ensayos pueden verse en las Figuras 5.15 y 5.16. Para arándanos Misty, el parámetro  $b^*$  aumentó para las frutas envasadas con películas AEL3, lo que indica que la coloración azul se tornó menos intensa. En tanto, la luminosidad de las frutas envasadas en *clamshells* (CL) y en AEL3 disminuyó por lo que la superficie se volvió más oscura, comparadas con el estado inicial, dando un aspecto pobre a la fruta. Cambios en los parámetros de color L y  $b^*$  en el mismo sentido, fueron encontrados por Chu y col. (2018) en arándanos sin recubrimiento ceroso (*bloom*).

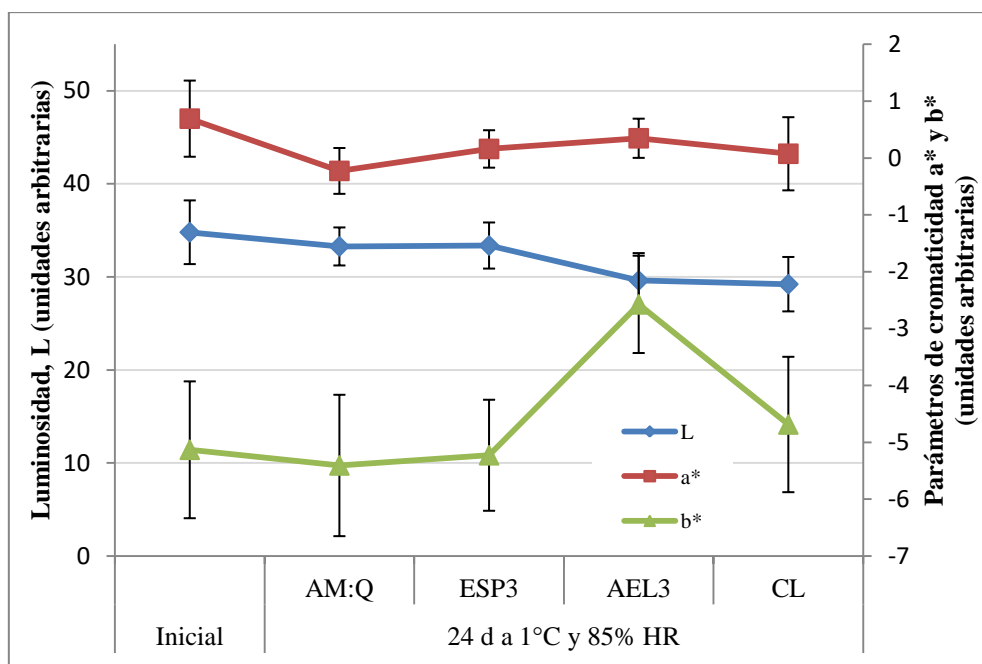


Figura 5.15: Evolución de los parámetros de color L, a\* y b\* de arándanos var. Misty conservados 24 d en refrigeración envasados en *clamshell* (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

En el segundo ensayo, para arándanos variedad Emerald, no se evidenciaron cambios significativos en los parámetros L y b\*, excepto para los frutos envasados con las películas activas con AEL, como era de esperar ya que no sólo no resultaron sistemas barrera eficientes sino que afectaron los parámetros fisiológicos de los frutos (SS y acidez) y posiblemente el contenido de antocianinas, el que se evidencia en la alteración del color superficial de los frutos. Como ya se mencionó, Perdonés y col. (2012, 2016) indicaron que la presencia de AEL en la formulación de recubrimientos a base de quitosano para frutillas afectó el metabolismo de los frutos modificando los patrones de respiración, la actividad enzimática del fruto y la madurez fisiológica, lo que se evidencia por cambios en los atributos de color de los frutos.

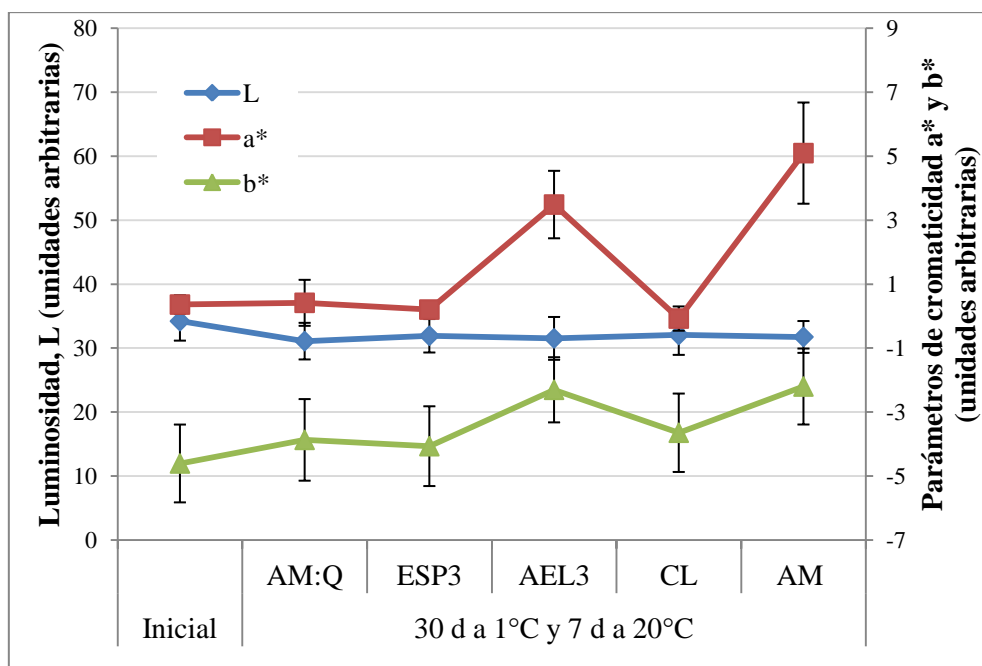


Figura 5.16: Evolución de los parámetros de color superficial L, a\* y b\* de arándanos var. Emerald conservados 30d a 1°C y 7d a 20°C envasados en *clamshell* (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).

### 5.3.1.6 Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos

La estructura química de los compuestos fenólicos consiste en uno o más anillos aromáticos con un grupo variable de grupos hidroxilos, que determinan su capacidad antioxidante (Balasundram y col., 2006; Khoddami y col., 2013), ya que estos grupos ceden electrones o átomos de hidrógeno neutralizando los radicales.

En los berries, el grupo más importante de compuestos fenólicos son los flavonoides, que consisten principalmente en antocianidinas, flavonoles, proantocianidinas (taninos condensados), flavonas y sus glicósidos. Otros compuestos fenólicos presentes en los berries son los taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, ligninas, entre otros (Kähkönen y col., 1999, Ramírez y col., 2015, Ruiz y col., 2015).

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante para las muestras luego de 30 días de almacenamiento a 1°C y 7 días a 20°C.

Tabla 5.5: Contenido de fenoles totales (FT) y capacidad antioxidante de arándanos var. Emerald almacenados 30 días a 1°C y 7 días a 20°C.

	FT (mg AC kg <sup>-1</sup> )	Capacidad antioxidante (mg TEAC kg <sup>-1</sup> )
Inicial	3502 ± 4.32 <sup>c</sup>	2276 ± 68.82 <sup>c</sup>
AM:Q	4802 ± 73.71 <sup>b</sup>	3428 ± 156.54 <sup>b</sup>
ESP3	2703 ± 102.05 <sup>d</sup>	1827 ± 99.01 <sup>d</sup>
CL	5606 ± 122.70 <sup>a</sup>	3816 ± 233.73 <sup>a</sup>
AM	2091 ± 25.49 <sup>e</sup>	1115 ± 29.24 <sup>e</sup>

AC: ácido clorogénico; TEAC: equivalentes a Trolox; AM:Q: película compuesta de almidón y quitosano; ESP3: película activa de extracto de semillas de pomelo; CL: *Clamshell*; AM: film para atmósfera modificada

Los valores obtenidos para el contenido de compuestos fenólicos totales son mayores a los indicados por otros autores: 104.6 ± 15.9 mg EAG/100 g fruta (Fabiani y col., 2013); 154 ± 2 mg EAG/100 g fruta (Guindán y col., 2012) utilizando ácido gálico como reactivo patrón para la curva de calibración. En cambio, Vázquez-Castilla y col. (2012) encontraron valores similares (entre 414 ± 31.90 y 726.9 ± 66 mg ácido gálico/100 g peso fresco). Es importante destacar que en este trabajo de Tesis y luego de un análisis preliminar de los extractos etanólicos por HPLC en fase reversa se determinó que el ácido clorogénico era el principal compuesto fenólico presente y por esta razón los resultados se cuantificaron con este estándar.

Cabe aclarar que a la fruta envasada en películas conteniendo AEL3 no se le determinó el contenido de FT ni la capacidad antioxidante, por encontrarse muy deshidratada, por lo que en estas condiciones esta determinación resultaba irrelevante.

Giuggioli y col. (2017), informaron que los cambios en el contenido de fenoles totales ocurrían más lentamente cuando la temperatura utilizada en la conservación era de 1°C, como en el presente trabajo.

La capacidad antioxidante se correlacionó satisfactoriamente con el contenido de compuestos fenólicos totales ( $r^2 > 0.99$ ).

Era de esperar que la capacidad antioxidante disminuya, en comparación con la fruta fresca, durante el almacenamiento de arándanos. Sin embargo, para la fruta a tiempo



inicial se obtuvieron bajos valores de polifenoles y capacidad antioxidante. Posiblemente, esto se deba a pérdidas durante su conservación hasta el momento en que se realizó la determinación. Por este motivo no es posible determinar el porcentaje de variación respecto al valor inicial.

Si bien, la capacidad antioxidante disminuyó en todas las muestras, los arándanos envasados en AM:Q presentaron un valor final cercano al de la fruta en *clamshells* (CL), seguido por las muestras envasadas con películas conteniendo ESP3. Resultan llamativas las diferencias observadas entre las películas biodegradables y las activas conteniendo ESP dado que presentan permeabilidades al O<sub>2</sub> similares y que las películas activas no presentaron actividad antioxidante *per se*, como se describió en el Capítulo anterior.

Los menores valores tanto de capacidad antioxidante como del contenido de compuestos fenólicos se obtuvieron para los frutos envasados con las películas comerciales aptas para atmósferas modificadas (AM). Al respecto, Remberg y col. (2003) afirmaron que arándanos envasados en *clamshells* y conservados al aire presentaron mayor capacidad antioxidante que los que se encontraban en atmósferas modificadas.

### 5.3.1.7 Deterioro fúngico

En la Fig. 5.17 pueden observarse los resultados promedios de la fruta con deterioro patológico, al finalizar el período de almacenamiento, para cada tratamiento.

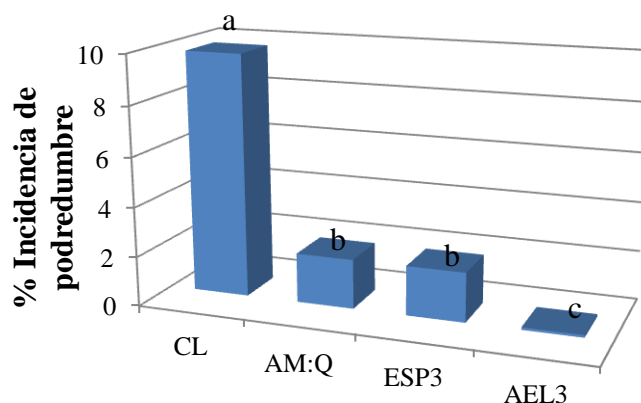


Figura 5.17: Incidencia de mohos en arándanos var. Misty durante su conservación en refrigeración envasados en *clamshell* (CL), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP3) y 3% de aceite esencial de limón (AEL3).

Los arándanos envasados en AM:Q, ESP3 y AEL3 tuvieron un efecto protector contra los microorganismos que deterioran la fruta. La diferencia con la fruta testigo (CL) resultó significativa ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, los frutos envasados en las películas AEL3, se encontraban deshidratados lo que probablemente impidió el crecimiento de mohos.

Por otra parte, al cabo del período de conservación en refrigeración (30 d), los arándanos var. Emerald envasados no evidenciaron crecimiento de mohos, por esta razón no se incluyen estos resultados (0% en todos los casos) en la Fig. 5.17. Luego durante 7 d a temperatura ambiente, se manifestaron los microorganismos presentes en la fruta (Fig. 5.18). Las muestras AEL3 presentaron un porcentaje de incidencia notablemente mayor que el resto de las muestras lo que se correlaciona con las modificaciones en los otros atributos de calidad analizados previamente.

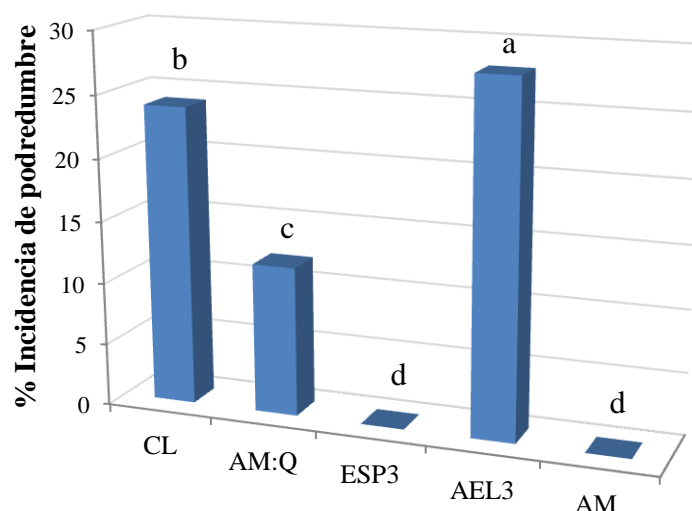


Figura 5.18: Incidencia de mohos en arándanos var. Emerald durante su conservación 30d en refrigeración y 7d a temperatura ambiente envasados en *clamshell* (CL), película comercial de atmósfera modificada (AM), películas biodegradables de almidón y quitosano (AM:Q) y películas biodegradables activas conteniendo 3% de extracto de semillas de pomelo (ESP) y 3% de aceite esencial de limón (AEL).

Los mohos predominantes que produjeron alteraciones en las frutas fueron: *Alternaria spp.*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum cladosporium*, lo cual coincide con lo observado por otros autores (Munitz, 2013; Zapata y col., 2013; Heredia, 2015).

En la Fig. 5.19 se pueden observar imágenes de las alteraciones causadas por *Alternaria spp.* La pudrición de arándanos causada por este moho produce en un principio lesiones hundidas en las bayas. Después se puede ver una masa gris-verdosa correspondiente al micelio fúngico y esporas de color verde oscuro en la superficie de la fruta. Resultados similares han sido informados por otros autores (France, 2015).

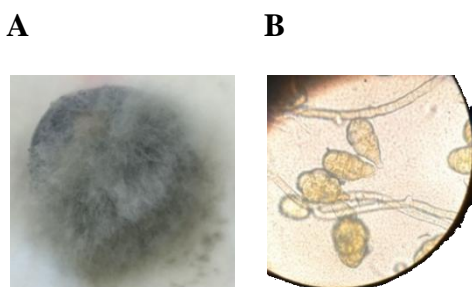


Figura 5.19: *Alternaria spp.* en arándanos. A: desarrollo en la fruta, B: conidios del moho.

Los síntomas de la putrefacción de la fruta por *Botrytis* incluyen el micelio de color gris-amarronado de crecimiento rápido con una apariencia esponjosa y masas de esporas que se elevan sobre tallos ramificados (conidióforos) (Fig. 5.20). El micelio de *Botrytis* es de coloración grisácea más intensa y menos denso que el micelio de *Alternaria* el cual se observa con una coloración más verdosa.

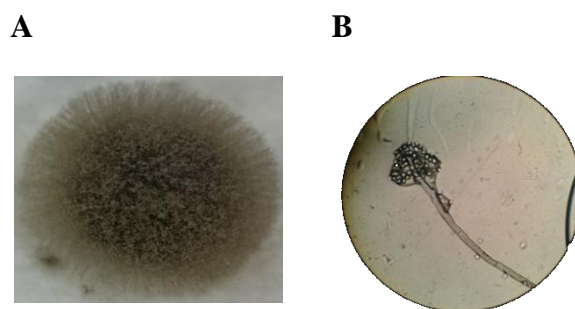


Figura 5.20: *Botrytis cinerea* en arándano. A: fruto con moho gris; B: detalle de conidióforo.

Por otra parte, en la Fig. 5.21 se observa antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*, se pueden ver las esporas del moho lo cual da una coloración naranja en la superficie.

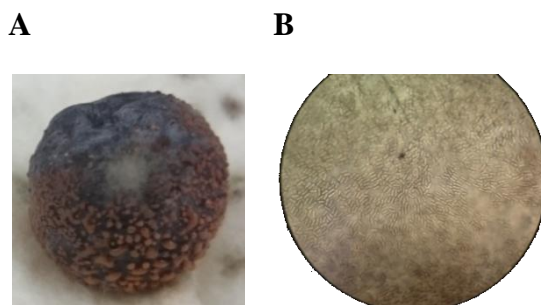


Figura 5.21: *Colletotrichum acutatum* en arándano. A: moho en fruta; B: conidios.

### 5.3.1.8 Características organolépticas

Al finalizar el período de conservación se procedió a evaluar las características organolépticas de las frutas envasadas de acuerdo a la siguiente calificación utilizando una escala hedónica de 3 puntos para cada atributo (Tabla 5.6).

Tabla 5.6: Características organolépticas de arándanos var. Emerald envasados y conservados 30 d en refrigeración + 7 d a temperatura ambiente.

Atributos	Calificación	Muestras				
		CL	ESP3	AEL3	AM:Q	Envase sintético AM
Aspecto	Ceroso				X	
	Medianamente ceroso	X	X			
	No ceroso			X		X
Textura	Blanda	X		X		
	Semiturgente				X	
	Turgente		X			X
Aroma	Sin aroma				X	X
	Agradable		X			
	No agradable	X		X		

Como puede destacarse de la apreciación de las características organolépticas, las frutas envasadas en los envases testigo *clamshells* (CL) y en las películas activas conteniendo AEL3, no presentaban cualidades atractivas para su consumo.

Como era de esperar el envase obtenido con las películas sintéticas comerciales aptas para almacenamientos en atmósferas modificadas resultaron con buenas características organolépticas de turgencia pero afectaron a la conservación del *bloom* y aroma de los

frutos. Las películas biodegradables AM:Q permiten obtener envases en los cuales se mantienen las características organolépticas de los arándanos, principalmente su aspecto ceroso y características de semiturgencia en los frutos. Los envases activos con ESP3 serían la mejor alternativa ya que si bien se observa un aspecto semiceroso los frutos retienen su turgencia y aroma agradable.

### 5.3.2 Evaluación de podredumbres mediante inoculación artificial de la fruta

En la Tabla 5.7 se presenta el porcentaje de fruta infectada y el índice de McKinney obtenidos para cada tratamiento, tanto para *Botrytis cinérea* como para *Alternaria alternata*.

En las pruebas realizadas, el mejor resultado se obtuvo con el envase obtenido con películas sintéticas aptas para atmósfera modificada, en tanto que no tuvo efecto antifúngico el envase con adición de aceite de limón.

La fruta envasada con películas biodegradables AM:Q y activas conteniendo ESP3 mostraron una reducción significativa ( $p > 0.05$ ) de frutos infectados por *Botrytis cinerea* como asimismo con podredumbre por *Alternaria*, en comparación con el testigo CL (Tabla 5.7). El índice de pudrición promedio por ambos mohos también resultó significativamente menor ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, todos los tratamientos redujeron la severidad de las podredumbres con respecto al testigo envasado en *clamshells* (CL).

Tabla 5.7: Podredumbres por *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* en arándanos Misty inoculados y almacenados en cámara húmeda a 20°C durante 9 días.

Envases	Fruta infectada (%)		Índice McKinney (%)		Severidad (1-5)	
	<i>Botrytis cinérea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Alternaria alternata</i>
AM	2.0 ± 2.3 <sup>c</sup>	7.0 ± 3.8 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.8 <sup>c</sup>	1	1
AM:Q	11.0 ± 6.0 <sup>b,c</sup>	12.0 ± 8.0 <sup>c</sup>	2.4 ± 1.5 <sup>c</sup>	2.4 ± 1.6 <sup>c</sup>	1.09	1
ESP3	18.0 ± 13.2 <sup>b</sup>	11.0 ± 7.6 <sup>c</sup>	3.6 ± 2.6 <sup>c</sup>	2.2 ± 1.5 <sup>c</sup>	1	1
AEL3	86.0 ± 19.8 <sup>a</sup>	92.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	17.2 ± 4.0 <sup>a</sup>	18.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	1	1.02
CL	24.0 ± 10.8 <sup>b</sup>	23.0 ± 3.8 <sup>b</sup>	9.2 ± 4.5 <sup>b</sup>	9.6 ± 2.0 <sup>b</sup>	1.92	2.09

Los valores informados corresponden a la media ± la desviación standard. AM: film para atmósfera modificada; AM:Q: película biodegradable de almidón y quitosano; ESP3: película activa con 3% de extracto de semillas de pomelo; AEL3: película activa con 3% de aceite esencial de limón; CL: envase comercial *clamshell*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la Fig. 5.22 se muestra la severidad en el caso de (A) arándanos envasados en *clamshells* (CL), (B) arándanos envasados en películas activas conteniendo AEL3, (C) fruta envasada en películas ESP3, y (D) fruta envasada en películas AM:Q.

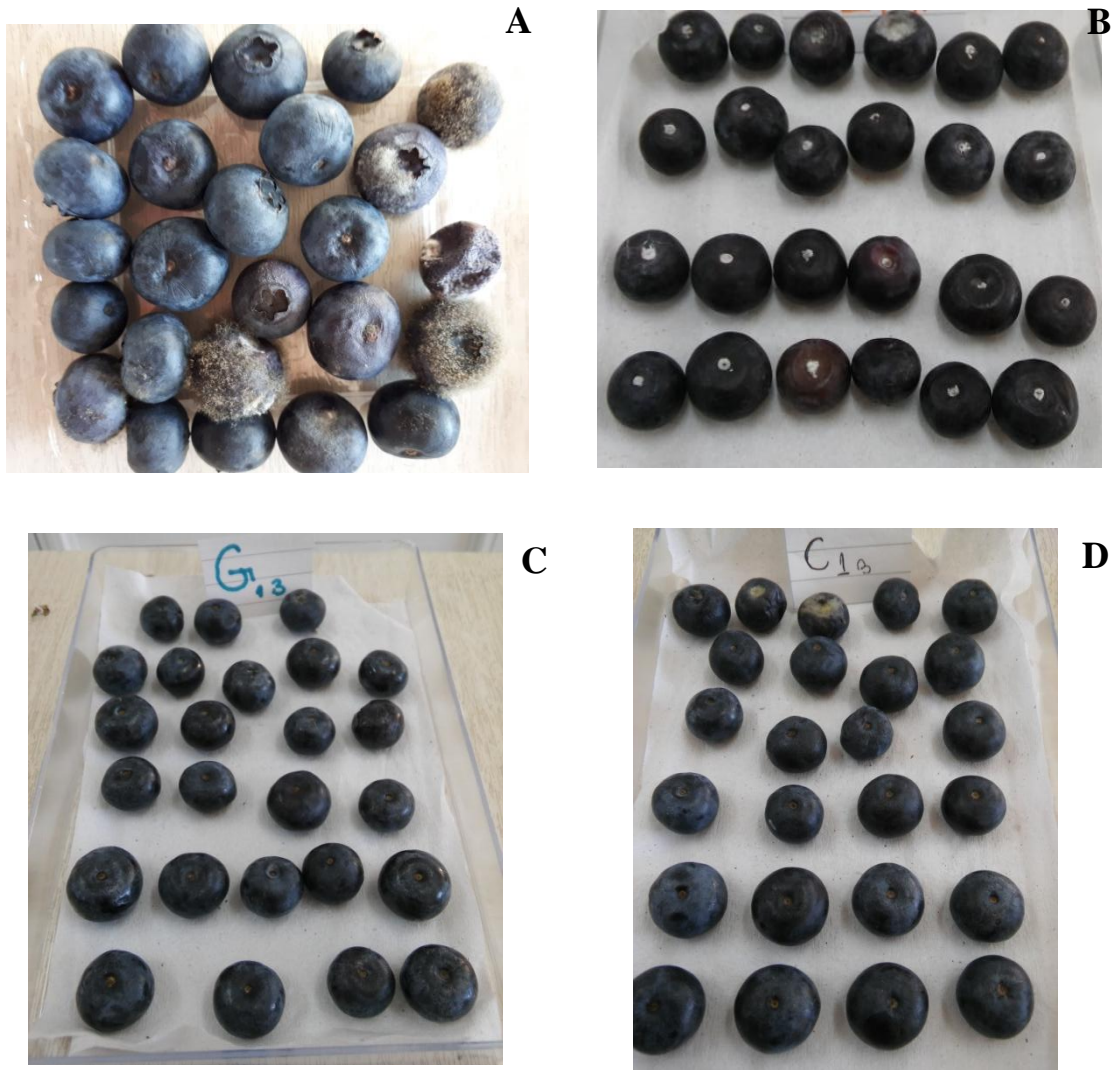


Figura 5.22: Fotografías de arándanos inoculados y envasados en A: *clamshells* (CL); B: películas activas AEL3; C: películas activas ESP3; D: película biodegradable AM:Q.

#### 5.4 Conclusión

El presente estudio demostró que las películas biodegradables a base de almidón y quitosano desarrolladas controlaron las pérdidas de peso poscosecha de los arándanos envasados durante su almacenamiento en refrigeración. Al respecto, sólo las películas activas conteniendo ESP en su formulación resultaron eficientes. En tanto que todos los envases biodegradables permitieron controlar la tasa respiratoria de los frutos durante el almacenamiento refrigerado. A pesar de que la capacidad antioxidante de la fruta disminuyó durante el almacenamiento, los arándanos envasados en las películas biodegradables AM:Q presentaron valores cercanos a los contenidos en *clamshells*.

A través del ensayo de inoculación artificial y la incidencia de podredumbres de la fruta envasada en el ensayo de conservación, las películas biodegradables, excepto AEL3, evidenciaron disminuir la podredumbre ocasionada por los géneros *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, en comparación al envase de uso tradicional (*clamshell*).

Se diseñó un ensayo en el cual se simuló condiciones de transporte refrigerado y de comercialización con el fin de evaluar la potencialidad de los envases desarrollados para la exportación de arándanos. Considerando un valor límite de aceptabilidad de pérdida de peso de 8%, la vida útil de los frutos envasados sería aceptable luego de 30 días de almacenamiento en todos los casos. Sin embargo, simulando el abuso térmico que se produciría en los puntos de comercialización (30 días a 1°C y 7 días a 20°C) los envases conteniendo AEL no cumplirían con este criterio de calidad. Si se restringe el criterio para estimar la vida útil a ausencia de podredumbres durante el período, sólo las formulaciones activas conteniendo ESP cumplen con esta condición en todo el período analizado.

Finalmente, los envases formulados con ESP manifestaron poseer propiedades de barrera adecuadas para contener arándanos manteniendo las mejores características organolépticas sin incidencia de podredumbres. Estos resultados son relevantes ya que indican que los envases biodegradables activos conteniendo ESP serían una alternativa interesante que podría utilizarse para envasado de arándanos destinados a la exportación.

### 5.5 Referencias bibliográficas

- Abugoch, L., Tapia, C., Plasencia, D., Pastor, A., Castro-Mandujano, O., López, L. & Escalona, V.H. (2016). Shelf-life of fresh blueberries coated with quinoa protein/chitosan/sunflower oil edible film. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 619-626.
- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., Harte, B. & Rubino, M. (2008). Postharvest shelf life extension of blueberries using a biodegradable package. *Food Chemistry*, 110, 120-127.
- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R. & Harte, J. (2010). Consumer acceptance of fresh blueberries in bio-based packages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1121-1128.
- AOAC (2005). Official Method 942.15. Acidity (Titrable) of Fruit Products. Official method of Analysis of AOAC International, ed. 18, Cap. 37, p. 10.
- Argentinian Blueberry Committee (2015) Statistics. Disponible on line: <http://www.argblueberry.com/en/estadisticas.html>. Consultado el 10/3/2018.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Beaudry, R.M., Cameron, A.C., Shirazi, A. & Dostal-Lange, D.L. (1992). Modified-atmosphere packaging of blueberry fruit: Effect of temperature on package O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117, 436–441.
- Bello, F.; Vázquez, D.; Heredia, A.M. & Almirón, N. (2010). Influencia del momento de cosecha sobre la calidad de frutos de arándanos en la región de Salto Grande, Entre Ríos. XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. p. 131. Rosario.
- Cantín, C.M., Palou, L., Bremer, V., Michailides, T.J. & Crisosto, C.H. (2011). Evaluation of the use of sulfur dioxide to reduce postharvest losses on dark and green figs. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 150–158.
- Chiabrando, V., Giacalone, G. & Rolle, L. (2009). Mechanical behaviour and quality traits of highbush blueberry during postharvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 989–992.
- Chiabrando, V. & Giacalone, G. (2011). Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-methylcyclopropene stored under air and controlled atmosphere. *Food Chemistry*, 126, 1812–1816.



- Concha-Meyer, A., Eifert, J.D., Williams, R.C., Marcy, J.E & Welbaum, G.E. (2015). Shelf Life Determination of Fresh Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Stored under Controlled Atmosphere and Ozone. *International Journal of Food Science*, 2015: 164143, doi: 10.1155/2015/164143.
- Chu, W., Gao, H., Chen, H., Fang, X. & Zheng, Y. (2018). Effects of cuticular wax on the postharvest quality of blueberry fruit. *Food Chemistry*, 239, 68–74.
- Defilippi, B., Robledo, P. & Becerra, C. (2013). Manejo de cosecha y poscosecha de arándano. En: Manual del arándano. Disponible online: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39102.pdf>.
- Deng, Y., Wu, Y. & Li, Y. (2005). Effects of high O<sub>2</sub> levels on postharvest quality and shelf life of table grapes during long-term storage. *European Food Research and Technology*, 221, 392–397.
- Døving, A. & Måge, F. (2002). Methods of testing strawberry fruit firmness. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B. *Soil & Plant Science*, 52, 43–51.
- Duan, J., Wu, R., Strik, B.C. & Zhao, Y. (2011). Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 71-79.
- Fabiani, G.L., Pérez, E.E., Corral, L., Salguero, A.R., González, M., Tereschuk, M.L. & Boggetti, H.J. (2013). Evaluación del contenido de antioxidantes en extractos convencionales y supercríticos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). Investigaciones en Facultades de Ingeniería del NOA. ISSN N° 1853-7871.
- Fava, J., Alzamora, S.M. & Castro, M.A. (2006). Structure and nanostructure of the outer tangential epidermal cell wall in *Vaccinium corymbosum* L. (Blueberry) fruits by blanching, freezing–thawing and ultrasound. *Food Science and Technology International*, 12, 241–251.
- Figueroa, D., Guerrero, J. & Bensch, E. (2010). Efecto de momento de cosecha y permanencia en huerto sobre la calidad en poscosecha de arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. berkeley, brigitta y elliot durante la temporada 2005-2006. *Idesia*, 28, 79-84. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292010000100011>.
- Fonseca, S.C., Oliveira, F.A.R. & Brecht, J.K. (2002). Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of Food Engineering*, 52, 99–119.

- Forney, C.F. (2008). Postharvest issues in blueberry and cranberry and methods to improve market-life. In: Hummer K.E., editor. IX International Vaccinium Symposium. *ISHS Acta Horticulturae*, 810, 785–798.
- France, A. (2015). Manejo de enfermedades en arándano. Capítulo 6 del Manual del arándano. Recuperado de: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39099.pdf>
- Giacalone, G., Peano, C., Guarinoni, A., Beccaro, G. & Bounous, G. (2002). Ripening curve of early, midseason and late maturing highbush blueberry cultivars. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 574, 119-121.
- Giongo, L., Poncetta, P., Loretto, P. & Costa, F. (2013). Texture profiling of blueberries (*Vaccinium* spp.) during fruit development, ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 34–39.
- Godoy, C.A. (2004). Conservación de dos variedades de arándano alto en condiciones de frío convencional. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 1, 53-61.
- Giuggioli, N.R., Girgenti, V. & Peano, C. (2017). Qualitative Performance and Consumer Acceptability of Starch Films for the Blueberry Modified Atmosphere Packaging Storage. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 67, 129–136.
- Guindán, C., Maldonado, P., Tereschuk, M.L., González, M.; Cerutti, G. & Albarracín, P. (2012). Arándanos y duraznos: análisis nutricional y actividad antioxidante. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ISBN-13: 978-987-28845-0-5. Córdoba, pág. 708.
- Harb, J.Y. & Streif, J. (2004). Controlled atmosphere storage of Highbush blueberries cv. ‘Duke’. *European Journal of Horticultural Science*, 69, 66–72.
- Heredia, A.M. (2015). Evaluación de prácticas de manejo que influyen la calidad poscosecha de frutas de arándanos de la región de Salto Grande, Argentina. (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Entre Ríos).
- Howard, L., Clark, J. & Brownmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1238-1247.
- Huang, Y. & Chen, H. (2014). A novel water-assisted pulsed light processing for decontamination of blueberries. *Food Microbiology*, 40, 1-8.

- Iqbal, T., Rodrigues, F.A.S, Mahajan, P.V. & Kerry, J.P. (2009). Mathematical modeling of the influence of temperature and gas composition on the respiration rate of shredded carrots. *Journal of Food Engineering* 91(2):325-332.
- Jackson, E.D., Sanford, K.A., Lawrence, R.A., McRae, K.B. & Stark, R. (1999). Lowbush blueberry quality changes in response to prepacking delays and holding temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 15(2), 117–126.
- Kader, A.A., Zagory, D. & Kerbel, E.L. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28 (1), 1–30.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Khazaei, J. & Mann, D.D. (2004). Effects of temperature and loading characteristics on mechanical and stress-relaxation properties of sea buckthorn berries. Part 1. Compression tests. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal of Scientific Research and Development*, 6, 3–11.
- Khoddami, A., Wilkes, M. & Roberts, T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328–2375.
- Mahajan, P.V. & Goswami, T.K. (2004). Extended storage life of litchi fruit using controlled atmosphere and low temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 28, 388–403.
- Mannozi, C., Cecchini, J.P., Tylewicz, U., Siroli, L., Patrignani, F., Lanciotti, R., Rocculi, P., Dalla Rosa, M. & Romani, S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 440-444.
- Munitz, M. (2013). Arándanos: micoflora contaminante, micotoxinas, residuos de fungicidas y cinéticas de degradación. (Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires). Recuperado de: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5270\\_Munitz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5270_Munitz.pdf)
- Nunes, M.C.N., Emond, J.-P. & Brecht, J.K. (2004). Quality Curves for Highbush Blueberries as a Function of the Storage Temperature. *Small Fruits Review*, 3, 423-440.

- Perdonés, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A. & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32–41.
- Perdonés, A., Escriche, I., Chiralt, A. & Vargas, M. (2016). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on volatile profile of strawberries during storage. *Food Chemistry*, 15, 979-986. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.054.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J.K., & Howard, L. (2008). Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 280–285.
- Preedy, V. (2015). Capítulo 21 “Blueberry Phenolic Compounds: Fruit Maturation, Ripening and Post-Harvest Effects”. En Processing and impact on active components in food. Editor: Victor Preedy. Londres, pág. 174.
- Prior, R. & Wu, X. (2013). Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health. *American Journal of Biomedical Sciences*, 5(2), 126-139.
- Ramírez, J.E., Zambrano, R., Sepúlveda, B., Kennelly, E.J. & Simirgiotis, M.J. (2015). Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 176, 106–114.
- Remberg, S.F., Haffner, K. & Blomhoff, R. (2003). Total Antioxidant Capacity and other Quality Criteria in Blueberries cvs ‘Bluecrop’, ‘Hardyblue’, ‘Patriot’, ‘Putte’ and ‘Aron’ after Storage in Cold Store and Controlled Atmosphere. 8th International CA Conference. Editores: J. Oosterhaven & H.W. Peppelenbos. Acta Hort 600, ISHS.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M. & Smilanick, J.L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 141–147.
- Ruiz, A., Bustamante, L., Vergara, C., Von Baer, D., Hermosín-Gutiérrez, I., Obando, L. & Mardones, C. (2015). Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of South Patagonia. *Food Chemistry*, 167, 84–90.
- Saftner, R., Polashock, J., Ehlenfeldt, M., & Vinyard, B. (2008). Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 19–26.

- Sagpya (2015). Protocolo de calidad para arándanos frescos. Resolución SAGyP N° 201/2007. Consultado: 15/04/2018. Disponible online: [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Sello/sistema\\_protocolos/SAA006\\_Arandanos\\_frescos.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Sello/sistema_protocolos/SAA006_Arandanos_frescos.pdf)
- Salunkhe, D.K., Bolin, H.R. & Reddy, N.R. (eds) (1991). Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables. Volume I. Fresh Fruits and Vegetables. CRC Press, Boston, MA, EEUU.
- Sargent, S.A., Brecht, J.K. & Forney, C.F. (2006). Blueberry harvest and postharvest operations: quality maintenance and food safety. En: Childers, N. F. & Lyrene, P. M., editors. *Blueberries for Growers, Gardeners, Promoters*. Dr. Norman F. Childers Publications, Gainesville, Florida (EEUU), 139–151.
- Servili, A., Feliziani, E. & Romanazzi, G. (2017). Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 133, 36–40.
- Silva, J.L., Marroquin, E., Matta, F.B., Garner, J.O. & Stojanovic, J. (2005). Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1815–1821.
- Smagula, J.M., Litten, W., Chen, Y. & Dunham, S. (1997). Variation of fruit set and fruit characteristics of wild lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* alt.) in a managed field. *Acta Horticulturae*, 446, 109–115.
- Sun, X., Narciso, J., Wang, Z., FERENCE, C., Bai, J. & Zhou, K.J. (2014). Effects of chitosan-essential oil coatings on safety and quality of fresh blueberries. *Journal of Food Science*, 79, 955-960.
- Swift, J.E. (2010). Effects of frozen storage and harvest time on the textural and sensory properties of rabbiteye blueberries (*Vaccinium virgatum* Aiton). (Tesis de Maestría). NCSU, Raleigh, NC, EEUU. <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/6361>.
- Vásquez, P., Baldomá, J.A., Wright, E.R., Pérez, A. & Divo de Sesar, M. (2007). First Report of Blueberry Botrytis Blight in Buenos Aires, Entre Ríos, and Córdoba, Argentina. *Plant Disease*, 91, 639.
- Vázquez-Castilla, S., Guillén-Bejarano, R., Jaramillo-Carmona, S., Jiménez-Araujo, A. & Rodríguez-Arcos, R. (2012). Funcionalidad de distintas variedades de

- arándanos. VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos. Universidad de Castilla - La Mancha. España.
- Wang, S.Y., Chen, C.-T. & Yin, J.-J. (2010). Effect of allyl isothiocyanate on antioxidants and fruit decay of blueberries. *Food Chemistry*, 120, 199–204.
- Wisuthiphaet, N., Damerow, L. & Blanke, M.M. (2014). Non-destructive detection of the wax bloom on European plum during post-harvest handling. *Journal of Food Engineering*, 140, 46–51.
- Zapata, L.M., Malleret, A.D., Quinteros, C.F., Lesa, C.E., Vuarant, C.O., Rivadeneira, M.F. & Gerard, J.A. (2010). Evaluación de la firmeza de bayas de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) durante su maduración. *Arándanos: Avances Científicos-Tecnológicos en la región de Salto Grande*, 159-169.
- Zapata, L., Heredia, A., Malleret, A., Quinteros, F., Cives, H. & Carlazara, G. (2013). Evaluación de parámetros de calidad que ayuden a definir la frecuencia de recolección de bayas de arándanos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14, 186-194. ISSN 1665-0204. Consultada: 12/04/18. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81329290013>>
- Zheng, Y., Yang, Z. & Chen, X. (2008). Effect of high oxygen atmospheres on fruit decay and quality in Chinese bayberries, strawberries and blueberries. *Food Control*, 19, 470–474.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

---

## Conclusiones generales

En la presente Tesis doctoral se diseñaron, formularon y caracterizaron materiales para el envasado de arándanos frescos, con el objetivo de prolongar la vida útil de esta fruta. Esta tecnología propuesta disminuiría la polución medioambiental mediante el desarrollo de películas biodegradables y a su vez aprovecharía subproductos de la industria cítrica de la región, con el impacto socio-económico que esto conlleva.

El quitosano y el almidón de maíz contribuyeron a la matriz con sus propiedades individuales y las resultantes de la interacción entre ellos. Los dos biopolímeros, presentaron buena compatibilidad, permitiendo el desarrollo de materiales compuestos translúcidos, homogéneos y con buena integridad estructural. El peso molecular del quitosano influyó marcadamente en las propiedades de las películas resultantes. Las características de las películas compuestas a base de almidón y quitosano resultan de la sinergia entre ambos biopolímeros. Así, el quitosano aporta su capacidad antimicrobiana *per se* y mejora las propiedades de barrera de los sistemas compuestos. El almidón por su parte le confiere a las películas capacidad de termosellado permitiendo la obtención de envases biodegradables. Asimismo, el glicerol incorporado a la matriz mejora las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos. El estudio de las propiedades mecánicas, de barrera y el análisis de los costos involucrados, entre otras, permitieron seleccionar la mezcla 75% de almidón y 25% de quitosano como la óptima para el diseño de envases termosellables.

La inclusión de aceite esencial de limón (AEL) en la formulación de películas activas introdujo discontinuidades en la matriz, lo cual se evidenció por la presencia de microgotas en la microestructura evaluada al SEM. En cambio, el extracto de semillas de pomelo (ESP) de naturaleza hidrofílica resultó compatible con las soluciones filmogénicas y se incorporó adecuadamente formando una matriz homogénea.

Las propiedades mecánicas a la tracción se vieron afectadas por la incorporación de compuestos activos y su concentración, siendo menos rígidas y resistentes, pero más flexibles que las películas sin compuestos activos, aunque no modificaron las propiedades de barrera al oxígeno y al vapor de agua.

Los envases obtenidos permitieron preservar la calidad de arándanos con la ventaja de su bajo impacto ambiental, permeabilidad selectiva a gases y capacidad antimicrobiana. Los



mejores resultados se obtuvieron con extracto de semillas de pomelo, el cual logró controlar el crecimiento de mohos durante la conservación en refrigeración de arándanos.

El presente estudio demostró que las películas biodegradables desarrolladas a base de almidón y quitosano ensayadas controlaron las pérdidas de peso poscosecha de los arándanos envasados durante su almacenamiento en refrigeración, comparadas con el sistema tradicional de envasado en *clamshells*.

Se diseñó un ensayo en el cual se simularon condiciones de transporte refrigerado y de comercialización con el fin de evaluar la potencialidad de los envases desarrollados para la exportación de arándanos (30 días a 1°C) teniendo en cuenta además el abuso térmico que se produciría en los puntos de comercialización (7 días a 20°C). Considerando como criterio para estimar la vida útil del producto un valor límite de aceptabilidad de pérdida de peso menor al 8% y ausencia de podredumbres durante el período, sólo las formulaciones activas conteniendo ESP cumplen con esta condición en todo el período analizado. Además, los envases formulados con ESP permitieron mantener las características organolépticas de los arándanos, controlando la deshidratación de los frutos y sin incidencia de podredumbres.

*Finalmente, se destaca el impacto regional del presente trabajo de Tesis ya que se han diseñado envases biodegradables activos para la conservación de arándanos utilizando en las formulaciones subproductos de la industria citrícola. Los envases biodegradables activos conteniendo ESP serían una alternativa interesante que podría utilizarse para el envasado de arándanos destinados a exportación.*

**ANEXO**

---

## Anexo

### **Determinación de la actividad antifúngica y de la concentración mínima inhibitoria de los compuestos activos utilizados**

La actividad antifúngica de ESP y AEL se determinó mediante el método de dilución en agar (Fraternali y col., 2003) con algunas modificaciones. El componente antimicrobiano se incorporó al medio de cultivo PDA a una temperatura de 40-45°C y luego se vertió en placas de Petri. Se ensayaron diferentes concentraciones del extracto de semillas de pomelo (ESP): 0.5, 2 y 3%. Como control se colocó una placa con agar sin el compuesto antimicrobiano. Una vez que el agar solidificó se inocularon los mohos: *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*. Para ello, a partir de un cultivo de mohos de 3 días de crecimiento, se cortó un disco de agar de 1 cm con material miceliar y se colocó en el centro de cada placa (Viuda-Martos y col., 2008; Junqueira-Gonçalves y col., 2013). Todas las placas inoculadas se incubaron a 25°C. Durante los 5 días siguientes se evaluó el crecimiento de los mohos.

En ensayos previos, se estudió la concentración mínima inhibitoria de extracto de semillas de pomelo (ESP) y aceite esencial de limón (AEL) contra dos cepas de mohos: *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, mediante el método de dilución en agar. Los agentes antimicrobianos se incorporaron al medio PDA en distintas concentraciones (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 % p/p). Se observó que no hubo formación de halo de inhibición para los componentes activos. Considerando lo descrito por otros autores (Cvetnić & Knezević, 2004) que encontraron CMI mayores para hongos, se ensayaron mayores concentraciones del extracto de semillas de pomelo (ESP): 0.5, 2 y 3%. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones de 0.5% de ESP serían suficientes para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*, como pueden observarse en la Fig. A.1. Resultados similares se encontraron con la incorporación de AEL como compuesto activo.

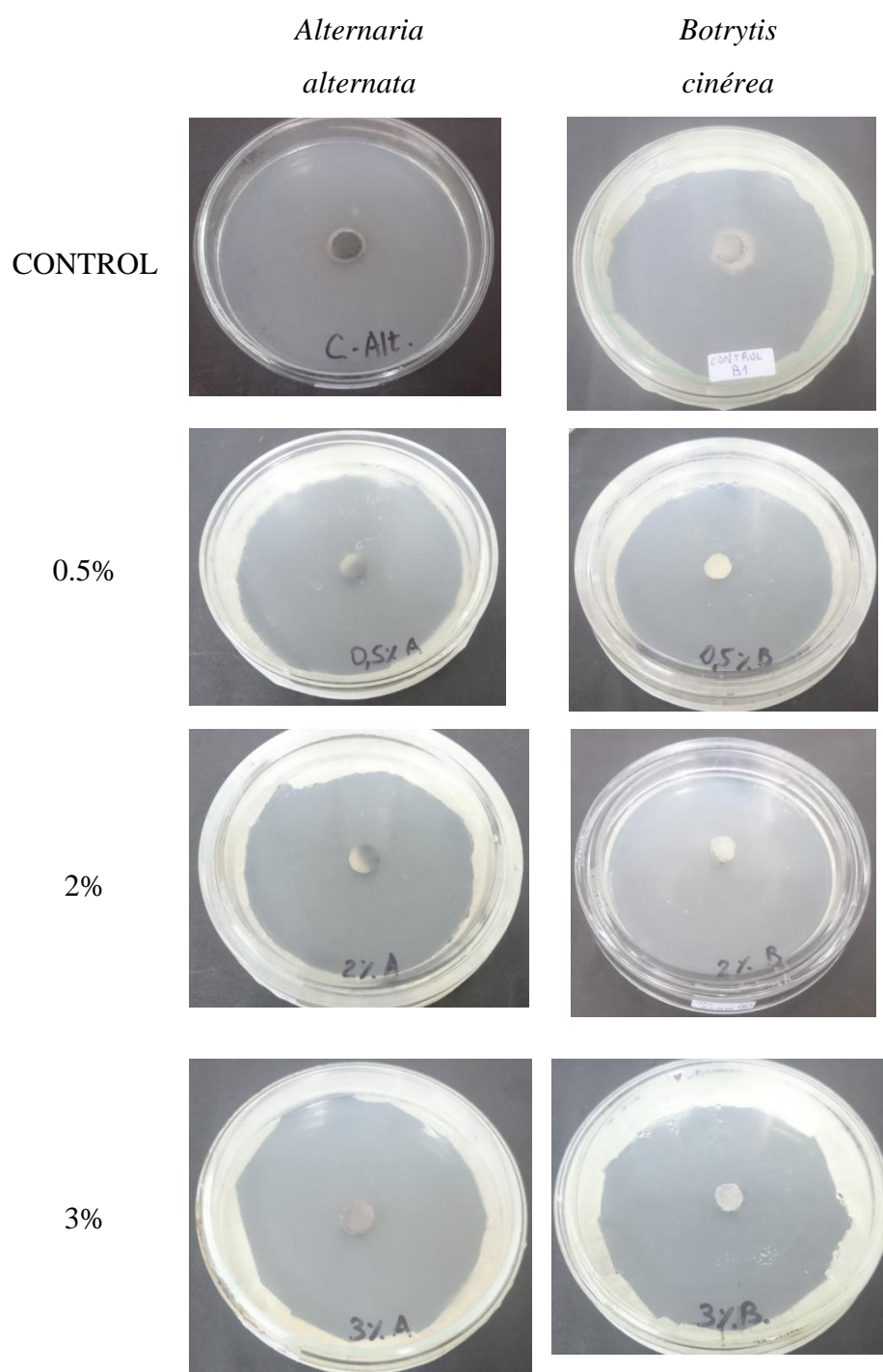


Figura A.1: Ensayo de determinación de la concentración mínima inhibitoria para extracto de semillas de pomelo contra *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata*

Según Gavara y col. (2015) la efectividad de un conservante dado contra un microorganismo específico depende de cómo se aplica, su concentración, el tipo de alimento y de otros factores. Por lo tanto, es difícil comparar la efectividad de la prueba *in vitro* descrita anteriormente con la efectividad del agente en un producto alimenticio, los resultados obtenidos utilizando condiciones *in vitro* con medios de crecimiento estándar y temperatura óptima de crecimiento microbiano generalmente no se pueden confirmar utilizando alimentos reales debido a interacciones con la matriz de alimentos o componentes de los mismos tales como proteínas, lípidos, cationes, etc. Estos datos son orientativos para utilizar en las pruebas “*in vivo*”.

**Referencias bibliográficas**

- Cvetnić, Z. & Knezević, V.S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*, 54, 243-250.
- Fraternale, D., Giamperi, L., & Ricci, D. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil obtained from in vitro plants of *Thymus mastichina* L. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 278–281.
- Gavara, R., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J.P. & Domínguez, I. (2015). Practical Guide to Antimicrobial Active Packaging. Smithers Pira Technology Ltd.
- Junqueira-Gonçalves, M.P., Alarcón, E. & Niranjana, K. (2013). Development of antifungal packaging for berries extruded from recycled PET. *Food Control*, 33, 455-460.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19, 1130–1138.