

[PID 8085](#)

Caracterización de películas comestibles antimicrobianas con adición de aceites esenciales de especies cultivadas en la provincia de Entre Ríos

Bordagaray, Valeria C.; Bof, Maria J.; Suárez, Gustavo D.; Bordenave, Lauro R.; Pérez, Adrián A.; Locaso, Delia E.

AUTORES: Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos. Monseñor Tavella 1450, Código Postal 3200. Concordia. Entre Ríos. Argentina.

CONTACTO: locasod@fcal.uner.edu.ar y/o bordagarayv@fcal.uner.edu.ar

Resumen

En la actualidad se encuentra en auge el uso de nuevas tecnologías para el control del crecimiento microbiano en la superficie de alimentos, para mantener su calidad y su seguridad. Una de las alternativas es el uso de envases activos con incorporación de aceites esenciales como antimicrobianos. El objetivo de este trabajo consiste en determinar las características fisicoquímicas y de barrera de películas antimicrobianas utilizando una matriz estructural compuesta de quitosano, almidón de maíz y aceite esencial de origen regional. La finalidad es poder disponer de nuevos materiales activos para envases contra las principales bacterias patógenas que afectan la salud humana. Se prepararon emulsiones a base de quitosano-almidón de maíz gelatinizado, con el agregado de aceites esenciales con probada actividad inhibitoria "in vitro" frente a los microorganismos de interés. Por método Casting se obtuvieron las películas y a continuación, se estudiaron la estabilidad y estructura de las emulsiones formadoras de película, y las propiedades fisicoquímicas y de barrera al vapor de agua de las películas. Este trabajo comprende una parte del proyecto de investigación PID UNER 8085 con el cual se obtuvieron materiales antimicrobianos caracterizados con posibilidades de aplicación en envases de alimentos.

Palabras clave: películas comestibles, quitosano, almidón de maíz, aceites esenciales, antimicrobiano

Objetivos propuestos y cumplidos

Objetivo general del proyecto

El objetivo del proyecto marco es obtener películas comestibles antimicrobianas, con características apropiadas para utilizar como nuevos materiales de envases alimentarios.

Objetivos específicos de este trabajo

- Preparar emulsiones a base de quitosano - almidón de maíz - aceites esenciales.
- Preparar películas utilizando las emulsiones.
- Caracterizar las emulsiones formadoras de film, desde el punto de vista de su estabilidad y tamaños de partículas logrados.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y barreras de películas de matriz estructural compuesta: quitosano - almidón de maíz - aceites esenciales.

Marco teórico

Los principales roles de los envases para alimentos son: proteger el producto de la influencia de entorno y de los daños, contenerlo y proveer información al consumidor (nutricional e ingredientes que contiene) (Giles, 2001). Permitir la trazabilidad, la comodidad de manipulación y la posibilidad de incluir indicaciones para su manipulación, son funciones secundarias de creciente importancia. El objetivo de los envases de alimentos es contener el alimento con una relación costo-efectividad que satisfaga los requerimientos industriales y del consumidor, manteniendo la seguridad y minimizando el impacto ambiental (Marsh y Bugusu, 2007).

La vida útil de los alimentos envasados queda definida por la velocidad con que se desarrollan diversos procesos, como procesos fisiológicos (respiración en vegetales y frutas frescas), procesos químicos (oxidación lipídica), procesos físicos (como envejecimiento del pan, deshidratación), microbiológicos (deterioro microbiano) e infestación. Mediante el uso de envases activos apropiados, estas condiciones pueden regularse de distintas maneras y el deterioro del alimento puede ser reducido significativamente.

Las técnicas de envasado activo pueden dividirse en tres categorías: absorbentes (secuestrantes), sistemas de liberación y otros sistemas. Los sistemas de absorción eliminan los compuestos no deseados, como oxígeno, dióxido de carbono, etileno, exceso de agua, contaminantes y otros compuestos específicos. Los sistemas de liberación añaden o emiten activamente compuestos en los alimentos envasados o en el espacio de cabeza del envase, tales como dióxido de carbono, antioxidantes y conservantes o antimicrobianos. Otros sistemas pueden tener diversas tareas, tales como calentamiento espontáneo, auto-enfriamiento y conservación.

La incorporación de agentes bioactivos antimicrobianos en los polímeros se ha aplicado comercialmente en el transporte de drogas y plaguicidas, artículos para el hogar, textiles, los implantes quirúrgicos y otros dispositivos biomédicos. Pocas aplicaciones relacionadas con los alimentos se han comercializado. Los aditivos "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS), no GRAS y antimicrobianos "naturales" se han incorporado en papel, materiales termoplásticos y termoestables y han sido probados contra una variedad de microorganismos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *E. coli* patógenas y en microorganismos alterantes, incluyendo mohos (Appendini y Hotchkiss, 2002).

La razón para la incorporación de agentes antimicrobianos en el envase es prevenir el crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos, que es donde se produce una gran parte del deterioro y la contaminación. Por ejemplo, la carne intacta de animales sanos es esencialmente estéril y el deterioro se produce principalmente en la superficie. Este enfoque contribuye a reducir la adición de agentes antimicrobianos en la formulación del alimento. La gradual liberación de un agente antimicrobiano a partir de una película de envasado a la superficie del alimento puede tener una ventaja sobre la inmersión y pulverización. En los últimos procesos, la actividad antimicrobiana se puede perder rápidamente debido

a la inactivación de los antimicrobianos por interacción con los componentes del alimento o por su dilución por debajo de la concentración activa debido a la migración en la matriz del alimento (Appendini y Hotchkiss, 2002).

Algunos polímeros son inherentemente antimicrobianos y se han utilizado en películas y recubrimientos. Los polímeros catiónicos tales como quitosano promueven la adhesión celular (Devlieghere et al., 2004) mediante la interacción de sus aminas cargadas con las cargas negativas de la membrana celular, provocando fugas de los componentes intracelulares.

El quitosano es un derivado N-deacetilado de la quitina, con un grado de deacetilación no menor al 65% (Majeti y Kumar, 2000; Pastor et al., 2004). Se ha utilizado como recubrimiento y mostró proteger las verduras y frutas frescas de la degradación fúngica. Aunque el efecto antimicrobiano se atribuye a las propiedades antifúngicas del quitosano, también puede actuar como una barrera entre los nutrientes contenidos en los productos y los microorganismos. Sumadas a estas propiedades, este polímero es biodegradable, biocompatible, no es tóxico y tiene capacidad de formar films (Arvanitoyannis, 1999; Tharanathan y Kittur, 2003). De manera que su uso en la producción de envases activos implica una respuesta a otra problemática: el impacto ambiental inherente a los residuos plásticos.

La preocupación ambiental por los residuos plásticos es creciente. El impacto que generan es producto de varios factores: su lenta degradación; el aumento de la producción de plásticos, al igual que la generación de sus residuos; su principal materia prima es no renovable, el petróleo, y algunos de los químicos utilizados para producir los plásticos son tóxicos. Éstos impactos no pueden ser valorados de acuerdo a criterios económicos exclusivamente, además hay un desconocimiento generalizado acerca de las posibilidades de regeneración y recuperación de los ecosistemas afectados por los residuos plásticos (Téllez Maldonado, 2012).

Las películas obtenidas a partir de quitosano presentan permeabilidad selectiva a los gases, tales como CO₂ y O₂, 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.

Las propiedades funcionales de las películas de quitosano pueden mejorarse a través de la combinación de este polímero con otros hidrocoloides (Vargas y col., 2009; Park y col., 2002) y con lípidos.

De los biopolímeros naturales disponibles para la preparación de films comestibles, el almidón es uno de los más comúnmente usados, debido a que es abundante, de bajo costo, renovable y biodegradable (Averous et al., 2001). Sin embargo, su aplicación es limitada debido a su elevada solubilidad en agua y fragilidad (Mathew et al., 2006). Con el objeto de mejorar esas propiedades, el almidón se utiliza en mezclas con otros biopolímeros para formar films compuestos. Se cree que la interacción mediante puentes de hidrógeno entre el quitosano y el almidón es un factor intrínseco que determina las propiedades mecánicas y físicas de los films que forman (Shen et al., 2010).

Varios investigadores han reportado que el almidón y el quitosano forman films compuestos miscibles y en su combinación mejoran propiedades de los films de los componentes individuales (Vásconez et al., 2009; Shen et al., 2010; Zhong et al., 2011; Feng et al., 2013).

En estudios previos realizados por este equipo de investigación, se formularon y caracterizaron películas comestibles, formuladas a partir de mezclas de distintas proporciones de quitosano y almidón de maíz. Los resultados indicaron que el uso de ambos polímeros resulta beneficiosa en su efecto sobre las propiedades mecánicas, ópticas, de barrera al vapor de agua y solubilidad de las películas compuestas (Bordagaray et al., 2014; Bof et al., 2014). A su vez, se determinó la compatibilidad del uso de mezclas de estos polímeros y la formación de películas con estructuras homogéneas, mediante el análisis de su microestructura (Bof et al. 2015).

Entre los compuestos naturales antimicrobianos que se pueden incorporar a las películas comestibles, se encuentran los aceites esenciales (EO). La actividad antimicrobiana contra patógenos como

Listeria monocytogenes, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* ha sido ampliamente estudiada in vitro (Burt, 2004, Bakkali y col. 2008) sin embargo su incorporación en recubrimientos o films de uso alimentario, han sido hasta el momento, bastante limitada.

Los EO de origen regional incluyen todos los obtenidos a partir de frutas cítricas, ya que Entre Ríos es la provincia argentina con mayor número de hectáreas cultivadas (41977 en 2013) y la segunda de mayor producción (704188 toneladas en 2013, datos Federcitrus, 2014). Además, se produce aceite esencial de romero, orégano y menta piperita.

Los EO cítricos están compuestos en un 88 a 95% por limoneno, que posee actividad antimicrobiana. También el citral, otro componente de estos aceites, se ha destacado como un compuesto activo en los aceites de cítricos, en especial contra el deterioro causado por *Penicillium digitatum* (Caccioni et al. 1998). Linalol es otro terpeno que está presente en naranja dulce, limón y bergamota y posee actividad antimicrobiana. Se ha determinado la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de estos aceites contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, que presentan valores próximos a 2,0 %v/v, para limón, naranja, pomelo y mandarina (Hammer et al., 1999).

El EO de romero (*Rosmarinus officinalis*) presentó valores de MIC de 0,125; 0,250 y 1,000 %v/v contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* respectivamente (Fu et al., 2007). Hammer et al. (1999) determinó MIC contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* de 1,0; >2,0 y de 1,0 %v/v respectivamente.

Fracciones de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) han demostrado tener actividad contra varias especies de bacterias, como *Salmonella* (Helander et al., 1998; Paster et al., 1990) y *Escherichia coli* O157: H7 (Burt et al., 2003). Se ha determinado la MIC contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, obteniendo valores de 0,12; 1,0 y 1,0 %v/v respectivamente (Hammer et al., 1999).

El aceite esencial de Menta piperita tiene una MIC (mg/ml) contra *Escherichia coli* de 1,25 a 2,5; *Salmonella typhimurium* 1,25, *Staphylococcus aureus* 0,625 a 1,25 y *Listeria monocytogenes* 0,156 a 0,625 (İşcan et al., 2002). Tsai et al. (2013) han determinado MIC de 0,15 y 0,08 %v/v contra *E. coli* y *S. aureus*.

La propuesta de este trabajo es obtener y caracterizar películas antimicrobianas utilizando una matriz estructural compuesta de quitosano, almidón de maíz y aceite esencial de origen regional. La finalidad es poder disponer de nuevos materiales activos para envases contra las principales bacterias patógenas que afectan la salud y los principales mohos deteriorantes de "berries" (uno de los alimentos de mayor producción en Entre Ríos).

Marco metodológico

Preparación de las emulsiones formadoras de películas

Solución madre de quitosano: se dispersa el Quitosano (Q) en polvo en una solución de Ácido acético glacial en agua destilada, en agitador Waring Blender a 18000 rpm por 1 minuto. El quitosano en polvo utilizado (Parafarm, Buenos Aires, Argentina) posee un Grado de desacetilación (DD) de: 83,72% ± 3,22% y un peso molecular de 444 kDa.

Solución de Almidón gelatinizado: se disuelve el almidón de maíz (A) en agua destilada y se deja en reposo por 15 minutos. Luego, se lleva a Baño María a 90°C por 20 minutos, agitando cada 4 minutos durante 30 segundos. Se deja enfriar a 50°C antes de realizar las distintas mezclas con quitosano.

Mezclas: a la solución de almidón gelatinizado se agrega el plastificante, glicerol y luego se mezcla la solución de quitosano, el emulsionante y el aceite esencial, intercalando con agitación durante 1 minuto. Una vez completa la mezcla se pasa por homogenizador UltraTurrax durante 2 minutos a 24000 rpm.

Para extraer las burbujas de aire de las soluciones, se lleva a bomba de vacío a una presión de 70 mmHg durante 15 minutos.

De acuerdo a estudios previos, llevados adelante por el equipo de trabajo del Laboratorio de Investiga-

ción en Postcosecha de Frutas (LIPOFRU), se encuentra previamente definida la proporción de los polisacáridos (Q y A) a ser utilizados en la formulación de las matrices base (Bordagaray, et al., 2014; Bof et al., 2015).

La elección del aceite se centró en la actividad antibacteriana que presentó en ensayos “in vitro” frente a cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella Typhimurium*, ambas patógenas humanas.

Se optó por el aceite esencial de Pomelo Blanco que mostró actividad inhibitoria contra ambas bacterias (según screening realizado, Bordagaray et al., 2017 y 2015) y que en comparación con los demás aceites, presenta un olor menos intenso y no resulta invasivo. Además los efectos antimicrobianos de la adición de este aceite en películas comestibles no se han encontrado en la bibliografía consultada. Las concentraciones de aceite esencial utilizadas fueron 0,0; 1,0; 2,0 y 3,0% p/p (QA 50-50, QA 50-50 1%P, QA 50-50 2%P y QA 50-50 3%P)

Caracterización emulsiones formadoras de películas

Distribución del tamaño de partículas: el diámetro medio superficial $d_{3,2}$ y la distribución de tamaños se determina en un Mastersizer 2000 Malvern (Worcestershire, UK), a tiempo 0 y 7 días. El diámetro promedio de Sauter ($d_{3,2}$) es una medida del área creada durante el proceso de homogenización, se obtiene a partir de la distribución en volumen mediante la fórmula siguiente:

$$d_{3,2} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{\sum_{i=1}^n \frac{V_i}{d_i}}$$

Donde: V_i : volumen de aceite contenido en partículas de diámetro d_i .

Determinación de la estabilidad de emulsiones - Dispersión de la luz: la estabilidad global de las diferentes emulsiones se determina realizando mediciones de dispersión de luz en un analizador Turbiscan Classic Formulacion (L'Unión, Francia) a tiempo 0 y diariamente durante 7 días. Este equipo permite hacer un barrido de la emulsión a lo largo del tubo de medida en diferentes instantes, obteniéndose una serie de perfiles del porcentaje de backscattering (BS%) en función del tiempo.

Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y barrera de las películas de matriz estructural compuesta: quitosano - almidón de maíz - aceite esencial

Preparación de los films: se producen mediante el método Casting. Se vierten 15 gramos de FFD en placas de Petri de plástico de 95 mm de diámetro y se lleva a estufa a 50°C por 14 horas. Transcurrido el tiempo de secado, se dejan estabilizar en desecadores con Humedad Relativa controlada (solución de glicerol al 72 %p/p) antes de su ensayo.

Espesor: se medirá con un micrómetro de resolución 0,01 mm.

Humedad: la humedad se determina por medida de la pérdida de peso de los films, durante el secado en estufa a 105°C hasta peso constante. Se determina por duplicado.

Solubilidad en agua a 25°C: se determina de acuerdo al método descrito por López et al. (2008) sobre piezas de film de 4 cm² en 80 ml de agua destilada bajo agitación a 200 rpm durante 1 hora.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP): se determina usando el método ASTM E96 (ASTM 2012) con algunas modificaciones. Luego de lograr el estado estacionario, las copas de aluminio con las piezas de film (Payme Elcometer 5100, Manchester, UK) se pesan (0,0001 g) al inicio y cada 1 hora durante 8 horas. El gradiente de presión parcial de vapor de agua usado es 2000 Pa, la medición se hace a 5°C. El cambio de peso de las celdas se determina a través del tiempo en una escala analítica. Se aplica regresión lineal y la pendiente permite el cálculo de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR, en g s⁻¹ m⁻²) y considerando el espesor del film se calcula la WVP (g/m s Pa).

Ensayo de tensión: las curvas tensión-deformación se obtienen utilizando el texturómetro TAX-T2i-Stable Micro Systems (Inglaterra) con un sistema de mordazas A/TG. Las probetas de film son de 6 cm de longitud y 0,7 cm de ancho. La resistencia a la tracción (TS, MPa), el módulo de elasticidad (Módulo de Young, MPa) y la elongación a la rotura (EB, %) se calculan según lo descrito por López, Lecot, Zaritzky y García (2011).

Ensayo de Punción: el test de punción se lleva a cabo en el mismo equipo que el anterior, usando un cabezal cilíndrico de 2 mm de diámetro (P/2). Se obtienen curvas de fuerza vs deformación y se determinan la fuerza máxima (N), la deformación (mm) y el área bajo la curva (N.mm).

Parámetros de color: la medición de color se lleva a cabo con un colorímetro CR-300 Minolta (Japón), calibrado previamente. Se usa la escala CIELAB, donde L* es la luminosidad, a* parámetro que representa la componente verde-rojo y b* representa la componente azul-amarillo.

La diferencia de color (ΔE) se calculará:

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

Donde: a_0^* , b_0^* and L_0^* son los parámetros estándar y a^* , b^* and L^* son las mediciones de la muestra.

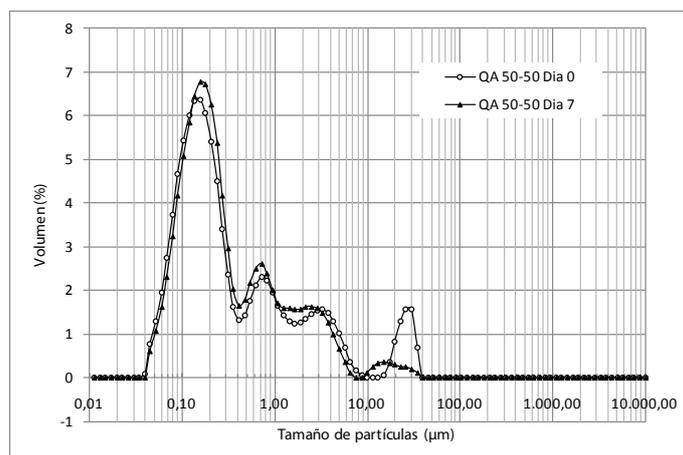
Síntesis de resultados y conclusiones

Distribución del tamaño de partículas

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el $d_{3,2}$:

%Aceite P	Día 0	Día 7
0	0,171 ± 0,002	0,176 ± 0,001
1	0,382 ± 0,026	0,298 ± 0,019
2	0,407 ± 0,011	0,347 ± 0,022
3	0,405 ± 0,012	0,347 ± 0,021

Tabla 1: valores $d_{3,2}$ al inicio y tras 7 días de almacenamiento en refrigeración (5°C)



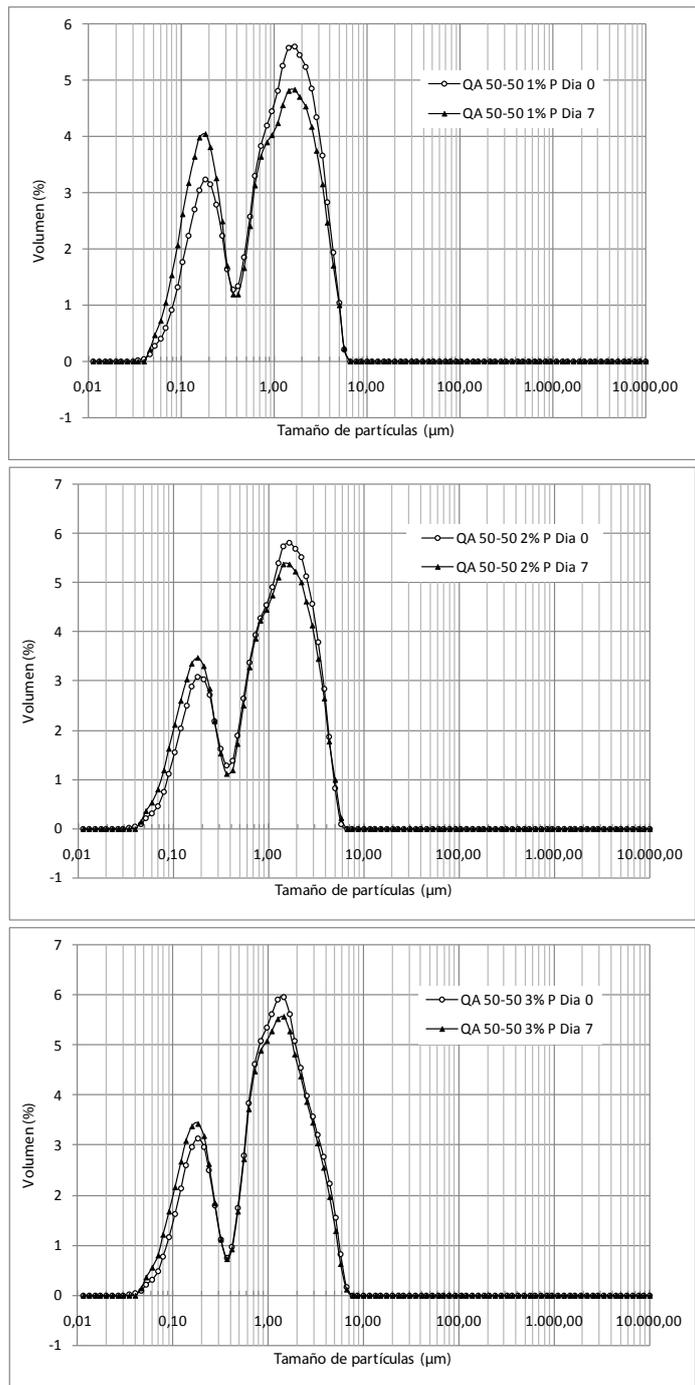


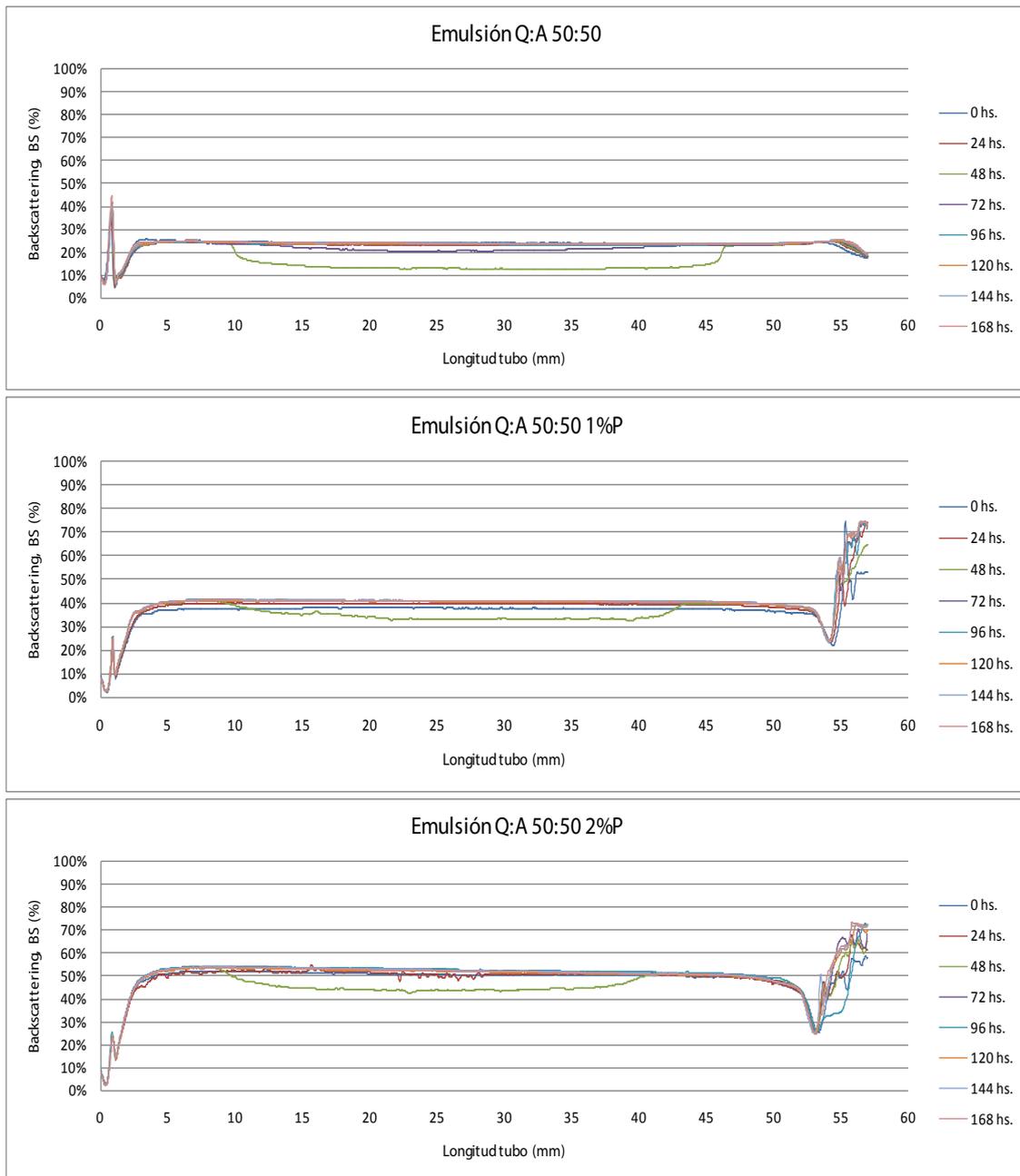
FIGURA 1: perfiles de volumen (%) vs tamaño de partículas (µm) para las distintas formulaciones

En todas las composiciones de las emulsiones se observa una leve reducción del tamaño de partículas con el paso del tiempo, lo que condice con lo obtenido en el análisis de la estabilidad mediante Turbiscan. A su vez, la distribución de tamaños es bimodal con un pico a los 0,2 µm y otro a los 1,8-2,0 µm aproximadamente, mostrando un aumento del Volumen (%) del día 0 al día 7 a menores tamaños y una reducción a mayores tamaños. Esto indicaría que el número de partículas pequeñas (0,2 µm) aumenta.

El caso de la dispersión QA 50-50 sin agregado de aceite es diferente: el tamaño de partículas aumenta ligeramente con el paso del tiempo, pero aún así mantiene su estabilidad durante el tiempo analizado (aunque se presentan BS% cercanos al 10%, en algunos puntos). La distribución de tamaños es polimodal.

Determinación de estabilidad de emulsiones

El método utilizado se basa en la detección de cambios en la transmisión y retrodispersión, como función del movimiento de las partículas (agregación, cremado y/o sedimentación). Cuando la muestra se expone a una luz del espectro Infrarrojo cercano (NIR), los objetos en suspensión (gotas, partículas sólidas, burbujas de gas, etc.) dispersan la luz, lo cual es detectado por el instrumento. A su vez, detecta la luz transmitida. La intensidad de la transmisión o retrodispersión depende de la cantidad de partículas que se hallan en suspensión. A continuación se adjuntan los perfiles logrados:



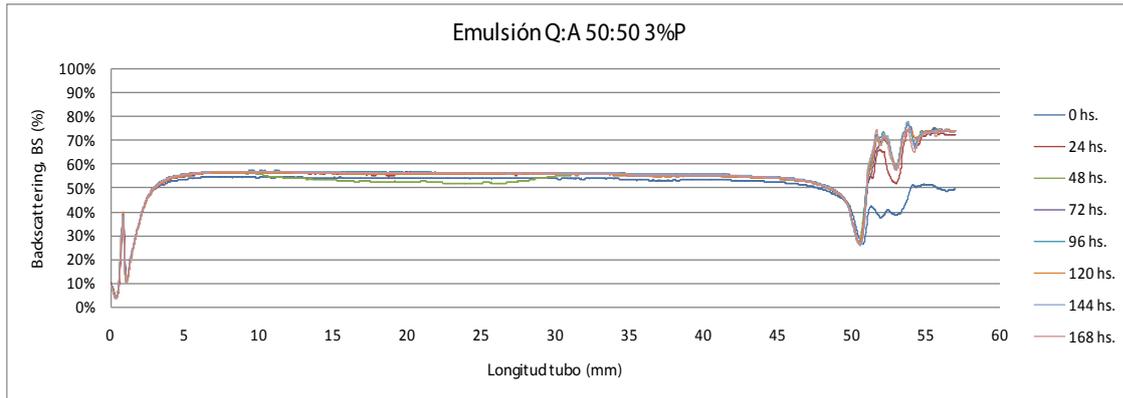


FIGURA 2: perfiles de BS (%) vs Longitud de tubo en mm para las distintas formulaciones



FIGURA 3: tubos de ensayo con emulsiones a base de Q y A con agregado de P.
a: QA 50-50; b: QA 50-50 1%P; c: QA 50-50 2%P; d: QA 50-50 3%P

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones con el paso del tiempo, comparando las distintas composiciones, se define una altura de referencia (en este caso 42,5 mm, de acuerdo a ensayos previos realizados por la integrante Bof, CICYTAC 2016). A continuación se pueden ver los perfiles resultantes:

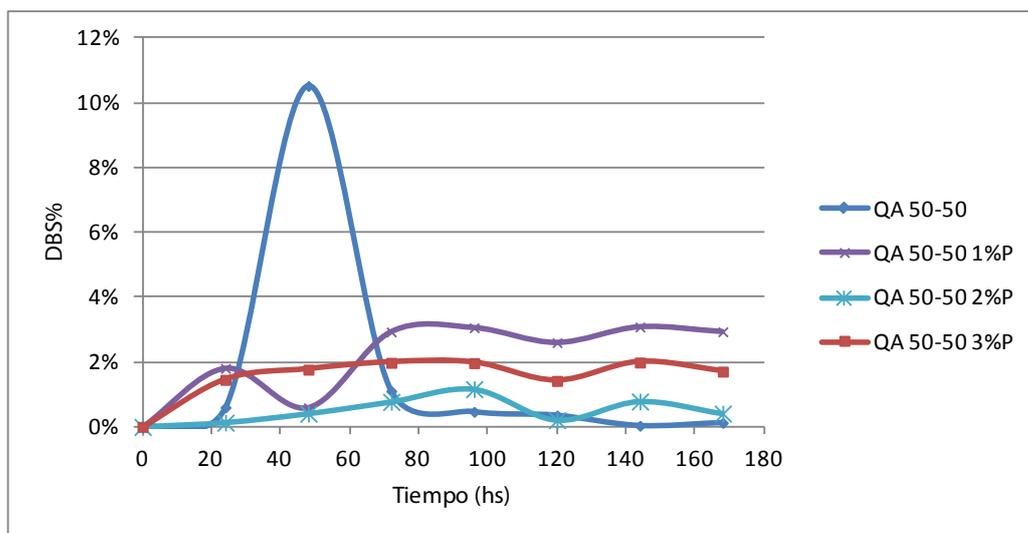


FIGURA 4: gráfico de Δ BS (%) vs tiempo (horas) para las formulaciones ensayadas a la altura de tubo de 42,5 mm.

La modificación de la señal de retrodispersión (backscattering, BS) puede ocurrir como función del tiempo y la migración de partículas, y se observa gráficamente como picos positivos (BS aumenta) o negativos (BS disminuye). Esto es, la migración de partículas desde el fondo del tubo a la parte superior conlleva una disminución de la concentración en el fondo de la muestra y como consecuencia una reducción de la señal de BS (pico negativo) y un aumento en la intensidad de la transmisión (pico positivo). Lo opuesto ocurre en la parte superior del tubo. Observando los perfiles de Backscattering (%) vs Longitud de tubo a los distintos tiempos, no se presentan picos positivos y negativos en toda la longitud, en las formulaciones ensayadas, a excepción de los que se presentan debido a la presencia del menisco (longitud entre 50 y 55 mm).

No se considera variación del tamaño de partícula cuando el perfil de BS está dentro del intervalo $\pm 2\%$. Variaciones superiores al 10% como valor positivo o negativo en la escala gráfica de BS son representativas de una formulación inestable (Celia et al., 2009).

A su vez, si consideramos los BS% al inicio para cada una de las formulaciones, podemos ver que la señal aumenta al aumentar la concentración de aceite esencial, como era de esperarse:

	QA 50-50	QA 50-50 1%P	QA 50-50 2%P	QA 50-50 3%P
BS% INICIAL (42,5 mm)	23,93%	37,54%	50,05%	53,04%

TABLA 2: BS (%) para las distintas formulaciones al inicio del período de almacenamiento

Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y barrera de las películas

Para la determinación de las propiedades fisicoquímicas y de barrera de las películas, se utilizaron las emulsiones QA 50-50, QA 50-50 1%P, QA 50-50 2%P y QA 50-50 3%P, descritas en el punto j.4). Para producir las películas se utilizó el método Casting, detallado previamente.

Espesor

Se realizaron cinco mediciones sobre cada película, cuatro en el perímetro y una central. Se tomó el promedio como valor del espesor. Los resultados se muestran en la tabla. No se observan diferencias significativas del espesor ante el agregado de aceite esencial hasta la concentración de 2%. La composición QA 50-50 3% sí mostró diferencias significativas (mayor espesor) respecto a QA 50-50.

Fórmula	Espesor (μm)
QA 50-50	84,43 \pm 2,73 ^a
QA 50-50 1%P	75,83 \pm 12,96 ^a
QA 50-50 2%P	87,75 \pm 1,30 ^a
QA 50-50 3%P	106,17 \pm 10,14 ^b

TABLA 3: valores medios de espesor para las distintas fórmulas de películas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Humedad

Los resultados para este parámetro fueron:

Fórmula	Humedad (%)
QA 50-50	41,74 \pm 2,82 ^a
QA 50-50 1%P	33,91 \pm 2,86 ^{ab}
QA 50-50 2%P	26,75 \pm 0,73 ^{ab}
QA 50-50 3%P	24,56 \pm 0,20 ^b

TABLA 4: valores medios de humedad para las distintas fórmulas de películas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Para el caso de las humedades se observan diferencias estadísticamente significativas entre QA 50-50 y QA 50-50 3%P, mientras que es posible observar similitudes intra grupo en los tres tratamientos que contienen diferentes porcentajes de aceite esencial P.

Solubilidad en agua a 25°C

Los resultados para solubilidad aparecen en la tabla siguiente:

Fórmula	Solubilidad (%)
QA 50-50	14,38 ± 0,25 ^b
QA 50-50 1%P	21,52 ± 0,53 ^a
QA 50-50 2%P	9,23 ± 0,53 ^c
QA 50-50 3%P	15,95 ± 1,00 ^b

TABLA 5: valores medios de solubilidad para las distintas fórmulas de películas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Los resultados obtenidos no son concluyentes respecto al efecto del agregado de aceite esencial sobre la solubilidad en agua de las películas poliméricas QA. La solubilidad aumenta significativamente con 1%P y se reduce significativamente con 2%P, respecto a QA 50-50. El agregado de 3%P no afecta esta propiedad.

Permeabilidad al vapor de agua

El vapor de agua es uno de los permeantes principales, porque puede transferirse, desde el interior o exterior, a través del envase cambiando la vida útil del alimento (Kanatt et al., 2012)

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de P mejoró significativamente la permeabilidad de las películas de QA, resultando QA 50-50 1%P y 2%P en el orden de lo indicado para el celofán por la bibliografía Tabla 11 (Gennadios et al.; 1994, Krotcha, 1992). No obstante estos valores son de 2 órdenes de magnitud mayores que los polímeros típicos de empaque, como son los polietilenos, probablemente debido al relativamente bajo nivel de sólidos de compuestos hidrofóbicos incorporados.

Formulación	WVP × 10 ⁻¹⁰ g m ⁻¹ Pa ⁻¹ s ⁻¹
QA 50-50	2,314 ± 0,087 ^b
QA 50-50 1%P	0,6279 ± 0,1073 ^a
QA 50-50 2%P	0,9129 ± 0,2398 ^a
QA 50-50 3%P	1,1164 ± 0,0856 ^a

TABLA 6: permeabilidad al vapor de agua (g/m.s.Pa) para las distintas formulaciones [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Film	P (g/m.s.Pa)
Cloruro de polivinilideno ^a	$0.7-2.4 \times 10^{-13}$
Polietileno de alta densidad ^{a,b}	2.4×10^{-13}
Polietileno de baja densidad ^{a,b}	$7.3-9.7 \times 10^{-13}$
Etilen-vinil acetato ^a	$2.4-4.9 \times 10^{-13}$
Poliéster ^a	$1.2-1.5 \times 10^{-12}$
Celofán ^b	$7.7-8.4 \times 10^{-11}$
Acetato de celulosa ^a	$0.5-1.6 \times 10^{-11}$
Almidón de alta amilosa	$2.0-10 \times 10^{-10}$
Gluten de trigo ^a	$1.4-4.6 \times 10^{-9}$
Aislado de proteína de soja ^a	$1.6-4.4 \times 10^{-9}$

TABLA 7: Permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles y poliméricas (Gennadios et al., 1994; Krochta et al., 1992)

Ensayo de Tensión

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Fórmulas	TS (MPa)	EB%	E (MPa)
QA 50-50	$17,49 \pm 3,11^c$	$24,07 \pm 7,94^a$	$67,15 \pm 6,11^b$
QA 50-50 1%P	$25,65 \pm 1,78^d$	$50,22 \pm 11,24^{b,c}$	$124,32 \pm 40,59^c$
QA 50-50 2%P	$11,38 \pm 0,56^b$	$60,52 \pm 3,23^c$	$6,44 \pm 0,63^a$
QA 50-50 3%P	$8,282 \pm 2,24^a$	$40,45 \pm 7,54^b$	$12,87 \pm 3,10^a$

TABLA 8: resistencia a la tracción (TS, MPa), módulo de elasticidad (módulo de Young, E, MPa) y elongación a la rotura (EB, %) del ensayo de tensión para las distintas películas ensayadas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Con el agregado de aceite esencial a concentraciones de 2 y 3%, se observa una disminución de la resistencia a la tracción (TS), un aumento de la extensibilidad (EB%) y disminución de la rigidez (E, MPa). Esto podría atribuirse al debilitamiento de las fuerzas de la red de polímeros Q y A, debido a la presencia de componentes del aceite que interrumpen los entrecruzamientos de las cadenas poliméricas (Bof et al., 2016).

A su vez, el aumento en la capacidad de estiramiento de la película causada por el agregado de aceite esencial indica que no solo provocó discontinuidades en la matriz sino que también interactuó con las cadenas de polímero, aumentando su capacidad de deslizamiento durante el ensayo de tracción, promoviendo la extensibilidad de la película (Kavoosi et al., 2013; Tongnuanchan et al., 2012; Bonilla et al., 2011).

Ensayo de Punción

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

	Fuerza máxima (N)	Deformación (mm)	Trabajo (N.mm)
QA 50-50	$2,70 \pm 0,46^a$	$2,92 \pm 0,23^a$	$7,18 \pm 1,12^a$
QA 50-50 1%P	$7,99 \pm 0,79^d$	$3,06 \pm 0,39^a$	$11,30 \pm 2,21^b$
QA 50-50 2%P	$6,26 \pm 0,98^c$	$2,86 \pm 0,20^a$	$8,27 \pm 1,37^a$
QA 50-50 3%P	$5,25 \pm 0,29^b$	$2,67 \pm 0,42^a$	$6,28 \pm 1,43^a$

TABLA 9: fuerza máxima (N), deformación (mm) y trabajo (N.mm) del ensayo de punción para las distintas películas ensayadas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

Se observa que el agregado de aceite esencial aumenta la fuerza máxima a la punción respecto al control QA 50-50. No se observa efecto sobre la deformación. Tampoco en el trabajo, excepto para la composición con 1% de aceite esencial.

Parámetros de color

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Fórmula	L*	a*	b*	ΔE
QA 50-50	92,82 ± 0,31 ^b	-2,16 ± 0,16 ^a	13,74 ± 1,82 ^b	98,79 ± 24,92 ^b
QA 50-50 1%P	85,09 ± 0,86 ^a	0,34 ± 0,006 ^c	0,36 ± 0,002 ^a	36,06 ± 7,41 ^a
QA 50-50 2%P	91,21 ± 3,77 ^b	-1,23 ± 0,91 ^b	11,81 ± 7,00 ^b	105,31 ± 41,66 ^b
QA 50-50 3%P	91,16 ± 0,30 ^b	-1,68 ± 0,12 ^{a,b}	19,61 ± 1,06 ^c	198,48 ± 21,18 ^c

TABLA 10: parámetro de color L, a, b y ΔE para las distintas fórmulas ensayadas [las medias que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$)].

La luminosidad (L*) no fue afectada por el agregado de aceite esencial, excepto a la concentración del 1%, que tuvo menor valor. El parámetro a* no sufrió grandes variaciones, mientras que el parámetro b* resultó mayor para el agregado de un 3% de P, que indica un color más amarillento respecto a las películas sin aceite. Al agregar aceite P, el ΔE mostró diferencias significativas respecto a las películas sin aceite, aumentando con concentraciones del 3% y reduciéndose con 1%.

A modo de conclusión

Se cumplieron los objetivos propuestos, obteniéndose películas comestibles antimicrobianas, que fueron caracterizadas en sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera. De acuerdo a los resultados expuestos, se considera necesario continuar trabajando, principalmente en mejorar la solubilidad en agua de la matriz polimérica y las propiedades mecánicas, ya que las películas se tornaron más frágiles con el agregado de aceite.

Bibliografía

- APPENDINI, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113–126.
- ARVANITOYANNIS, I. S. (1999). Totally and partially biodegradable polymer blends based on natural and synthetic macromolecules: Preparation, physical properties, and potential as food packaging materials. *Journal of Macromolecular Science—Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, C39(2), 205–271.
- AVEROUS, L., Fringant, C., & Moro, L. (2001). Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. *Polymer*, 42, 6565–6572.
- BOF, M. J., García, M. A., Locaso, D. & Zambón, Y. (2014). Películas compuestas a base de almidón y quitosano: formulación y caracterización. Libro de resúmenes. International Conference on Food Innovation. Food Innova 2014 (3rd ed.). (p. 148). Concepción del Uruguay: Universidad Nacional de Entre Ríos.
- 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.

- BORDAGARAY, V. C., Locaso, D. E., Zgolicz, P. D., Lare M. V. (2014). Caracterización de películas comestibles para utilizar como matriz base de envases para alimentos de alta a_w . Libro de resúmenes. International Conference on Food Innovation. Food Innova 2014 (3rd ed.). (p. 173). Concepción del Uruguay: Universidad Nacional de Entre Ríos.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- CACCIONI, D.R.L., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. and Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 73–79.
- DEVLEIGH, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703–714. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.008>
- FENG, Q., Hu, F., & Qiu, L. (2013). Microstructure and characteristics of high-amylose corn starch-chitosan film as affected by composition. *Food Science and Technology International*, 19(3), 279–287. <http://doi.org/10.1177/1082013212452474>.
- FU, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989–994. <http://doi.org/10.1002/ptr.2179>
- GILES, G. A. (2001). *Food packaging technology*. Sheffield: Sheffield Academic Pub.
- HAMMER, K.A., Carson, C.F., & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985–990.
- HELANDER, I. M., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2), 235–244.
- İŞCAN, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Hüsnü Can Başer, & Demirci, F. (2002). Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943–3946. <http://doi.org/10.1021/jf011476k>.
- MAJETI, N. y Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- MARSH, K., & Bugusu, B. (2007). Food Packaging: Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, 72(3), R39–R55. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- MATHEW, S., Brahmakumar, M., & Abraham, T. E. (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. *Biopolymers*, 82(2), 176–187. <http://doi.org/10.1002/bip.20480>.
- PARK, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*, 67(1), 194–197.
- PASTER, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., Ravid, U., 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11, 33–37.
- PASTOR, A., Agulló, E., Peniche, C., Tapia, C., Argüelles, W., Mayorga Nakamatsu, J. (2004). Quitina y quitosano: obtención caracterización y aplicaciones. CYTED IV.14 Fondo Editorial PUCP. .
- SHEN, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285–290. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.003>.

- TÉLLEZ MALDONADO, A., & others. (2012). La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/7080/>.
- THARANATHAN, R. y Kittur, F. (2003). Chitin—The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science*, 43(1), 61–87.
- TAI, M., Wu, C., Lin, T., Lin, W., Huang, Y., & Yang, C. (2013). Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils of Two Mint Species. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4). <http://doi.org/10.4314/tjpr.v12i4.20>.
- VARGAS, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536–547. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.009>.
- 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(7), 762–769. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.026>
- ZHONG, Y., Song, X., & Li, Y. (2011). Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch–chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 335–342. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.041>

PID 8085**Denominación del Proyecto**

Caracterización de películas comestibles antimicrobianas con adición de aceites esenciales de especies cultivadas en la provincia de Entre Ríos.

Directora

Locaso, Delia Elisa

Codirectora

Bordagaray, Valeria Carina

Unidad de Ejecución

Facultad de Ciencias de la Alimentación (UNER). Laboratorio de Investigación en Postcosecha de Frutas (LIPOFRU).

Dependencia

Universidad Nacional de Entre Ríos

Cátedra, Área o disciplina científica

Cátedras: Microbiología de los Alimentos, Propiedades Físicas de los Alimentos, Operaciones Unitarias II.

Área Temática: Ingenierías y tecnologías. Disciplina Científica: Otra Ingeniería – Ingeniería en Alimentos. Campo de Aplicación: INDUSTRIAL (producción y tecnología). Alimentos, Bebidas y Tabaco

Instituciones intervinientes públicas o privadas y convenios o acuerdos debidamente acreditados:

CIDCA, UNLP, CONICET, La Plata; INCAPE, UNL, CONICET, Santa Fe; ITA, UNL, Santa Fe (a través de los colaboradores externos)

Contacto

locasod@fcal.uner.edu.ar y/o bordagarayv@fcal.uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Locaso, Delia Elisa (FCAL, UNER); Bordagaray, Valeria Carina (FCAL, UNER); Bof, María Julieta (FCAL, UNER); Suarez, Gustavo Daniel (FCAL, UNER); Bordenave, Lauro Rafael (FCAL, UNER); Pérez, Adrián Alejandro (FCAL, UNER).

Colaboradores Externos

García, María Alejandra (CIDCA, UNLP, CONICET, La Plata); Zgolicz, Patricia Daniela (INCAPE, UNL, CONICET, Santa Fe); Santiago, Liliana (ITA, UNL, Santa Fe).

Becarios:

Pedrozo Favier, Paula (Beca Iniciación a la Investigación) y Laurent, Franco (Beca CIN)

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

01/12/2015 y 31/01/2018 respectivamente.

Aprobación del Informe Final por Resolución CS 042/19 (15/04/2019)