



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**ESTUDIOS BÁSICOS Y APLICADOS TENDIENTES AL
DESARROLLO DE PELÍCULAS COMESTIBLES QUE
SEAN SOPORTE DEL ANTIMICROBIANO
SORBATO DE POTASIO**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires*

LIC. SILVIA KARINA FLORES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LÍA NOEMÍ GERSCHENSON

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, 2006



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**BASIC AND APPLIED STUDIES FOR THE
DEVELOPMENT OF EDIBLE FILMS ACTING AS
CARRIERS OF THE ANTIMICROBIAL
POTASSIUM SORBATE**

LIC. SILVIA KARINA FLORES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LÍA NOEMÍ GERSCHENSON

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, 2006

A mis hijas, Ailen y Maria Sol

A mis padres, Josefa y Mario

A mi hermana, Alicia

A Pablo

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por la asignación de las becas que me permitieron realizar este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, al CONICET, a la ANPCyT y a la Fundación Antorchas, por el apoyo financiero brindado para la realización de la tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitar el uso de sus instalaciones.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, quien dirigió este trabajo, por la dedicación, el apoyo, la comprensión y el estímulo que siempre me brindó y, sobre todo, por su esfuerzo en la corrección de esta Tesis.

A la Dra. Carmen Campos, por su valioso aporte tanto en las tareas experimentales como en la discusión de los resultados microbiológicos.

A la Dra. Ana María Rojas, por su colaboración en el diseño de los ensayos y en la discusión de los resultados.

A la Lic. Lucía Famá por su asistencia en la determinación de las propiedades mecánicas y por sus animosas charlas.

A mis compañeras de grupo, por brindarme su ayuda, compañerismo, contención y por escuchar.

A mis padres, por su eterno apoyo y comprensión, en especial a mi mamá Josefa por su presencia, ayuda infinita y cariño que siempre me brindó.

A mis amigos y familiares por tolerar mi estado de “tesis” durante los últimos años.

A mis hijas, por soportar mis ausencias y por recibirme siempre con una sonrisa.

A Pablo, por su amor incondicional, su sacrificio y su ilimitada paciencia que hicieron posible transitar este largo camino para alcanzar mi objetivo.

Lic. Silvia Karina Flores

RESUMEN

Respondiendo a los permanentes requerimientos que surgen en materia de optimización en la preservación de alimentos, se ha puesto especial interés en el estudio de las llamadas películas comestibles. Estas películas pueden ser elaboradas a partir de hidrocoloides, como polisacáridos o proteínas, con el agregado de un agente plastificante a fin de obtener la flexibilidad deseada. Además de ser biodegradables y comestibles, las películas son capaces de conferir importantes propiedades funcionales a los alimentos recubiertos, mejorando su integridad estructural, desarrollando una barrera selectiva a los gases o actuando como soporte de aditivos o nutrientes. Estas películas no tienen como objetivo el reemplazar a los envases convencionales sino el contribuir de manera novedosa a la preservación, por ejemplo a través del soporte en superficie de antimicrobianos.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar películas comestibles a partir de almidón de mandioca, glicerol y sorbato de potasio, a fin de estudiar su eficiencia como soporte del antimicrobiano a través del desarrollo de distintas acciones tales como la de barrera, retención en superficie, y su potencial aplicación en la industria de los alimentos. También se caracterizó físico-químicamente las películas obtenidas y se estudió la relación entre dichas propiedades y el desempeño de estos materiales.

Los resultados obtenidos mostraron que los sorbatos actúan como un plastificante de las películas y que la técnica de fabricación puede seleccionarse a fin de obtener propiedades mecánicas y de barrera adecuadas para una dada aplicación. La biodisponibilidad de los sorbatos fue comprobada tanto en medio líquidos como sólidos, a través del estudio de su efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la levadura *Zygosaccharomyces bailii*. La rápida difusión del antimicrobiano desde la matriz amilácea hacia un medio receptor de alta actividad acuosa, como así también la formulación de las películas, condicionó su actividad antimicrobiana. La aplicación de las películas a trozos de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) estabilizados por impregnación osmótica, contribuyó a la prolongación de la vida útil del producto vegetal.

Los resultados obtenidos aportan información esencial para la caracterización de películas comestibles, contribuyendo así al conocimiento básico necesario para optimizar la potencial aplicación de estas películas a la preservación de alimentos.

Palabras claves: películas comestibles, almidón de mandioca, sorbato de potasio, propiedades físico-químicas, *Zygosaccharomyces bailii*, actividad antimicrobiana, preservación.

ABSTRACT

To meet constant requirements concerning optimization of food preservation, the study of edible films have received special attention. These films can be produced based on hydrocolloids, as polysaccharides or proteins, with the addition of a plasticizer for obtaining the adequate flexibility. These systems are not only biodegradable and edible but they can also provide important functional properties to the coated foods, improving its structural integrity, developing a selective barrier to gases and acting as carriers of additives or nutrients. These films do not have the objective of replacing conventional flexible films but to provide an additional hurdle for food preservation, for example acting as antimicrobial carriers.

The objective of the present research was the development of edible films using tapioca starch, glycerol and potassium sorbate, with the goal of studying its efficiency as antimicrobial carriers while acting as a barrier and surface retainer, and its potential application in food industry. Physico-chemical properties of films obtained were also evaluated and the relation between that properties and film performance was analysed.

Results obtained showed that sorbates act as film plasticizers and that filmmaking technique can be selected to obtain mechanical and barrier properties adequate for a certain application. Sorbate biodisponibility was observed in liquid and solid systems through the study of its inhibitory effect against *Zygosaccharomyces bailii* yeast. The high rate of diffusion of the antimicrobial from the starchy matrix to the receiving media of high water activity, as well as the film formulation influenced antimicrobial activity. Film application to pieces of butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) preserved through osmotic impregnation extended their shelf life.

Results obtained provide essential information for the characterization of edible films, helping to increase the basic knowledge that is needed for evaluating the potential application of these films for food preservation.

Palabras claves: edible films, tapioca starch, potassium sorbate, physico-chemical properties, *Zygosaccharomyces bailii*, antimicrobial activity, food preservation.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I. Películas comestibles. Su aplicación en la conservación de alimentos.....	2
II. Funcionalidad de las películas comestibles.....	3
III. Componentes de las películas.....	4
IV. Formación de las películas.....	5
V. Aplicación de las películas sobre el alimento.....	6
VI. Películas comestibles como portadoras de aditivos.....	7
VII. Aceptabilidad de los alimentos recubiertos con películas comestibles.....	7
VIII. Legislación.....	8
 OBJETIVOS	 10

CAPÍTULO 1: PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES.

INFLUENCIA DEL MÉTODO DE FABRICACIÓN

1.1

Introducción	13
1.1.1 Los componentes de las películas comestibles soporte de antimicrobianos.....	13
1.1.1.1 Almidón como matriz soporte.....	13
1.1.1.1.1 Consideraciones generales.....	13
1.1.1.1.2 Química del almidón.....	14
1.1.1.1.3 Estructura del gránulo.....	18
1.1.1.1.4 Gelatinización del almidón.....	19
1.1.1.1.5 Características de las pastas de almidón.....	20
1.1.1.1.6 Retrogradación del almidón.....	20
1.1.1.1.7 Almidón de mandioca.....	21
1.1.1.2 Agentes plastificantes.....	23
1.1.1.2.1 Consideraciones generales.....	23
1.1.1.2.2 El glicerol.....	24
1.1.1.3 Los antimicrobianos.....	26
1.1.1.3.1 Consideraciones generales.....	26
1.1.1.3.2 El ácido sórbico y su sal de potasio.....	27

1.1.2	Caracterización física y química de películas comestibles.....	36
36	1.1.2.1	Reología.....
	1.1.2.1.1	Ensayos mecánicos.....
	1.1.2.1.2	Estudios dinámicos.....
	1.1.2.1.3	Estudios cuasi-estáticos.....
	1.1.2.2	Cristalinidad
	1.1.2.2.1	Difracción por rayos X.....
	1.1.2.2.2	Características de los cristales de almidón.....
	1.1.2.2.3	Modelo estructural de la celda unidad en almidones tipo A y B
	1.1.2.3	Propiedades sorcionales y de barrera.....
	1.1.2.3.1	Isoterma de sorción de vapor de agua.....
	1.1.2.3.2	Permeabilidad al vapor de agua.....
	1.1.2.3.3	Permeabilidad a los gases.....
	1.1.2.4	Color.....
	1.1.2.4.1	Percepción del color.....
	1.1.2.4.2	Atributos de color.....
	1.1.2.4.3	Medición instrumental del color.....
	1.1.2.4.4	Cálculo de algunas funciones de color.....
1.1.3	Influencia del método de fabricación en las películas comestibles.....	55
1.1.4	Objetivos.....	56
1.2	 Materiales y métodos.....	57
1.2.1	Métodos de elaboración de películas comestibles.....	57
	1.2.1.1	Formulación de las películas.....
	1.2.1.2	Métodos de elaboración
1.2.2	Caracterización física y química de películas comestibles.....	59
	1.2.2.1	Ensayos mecánicos.....
	1.2.2.1.1	Ensayos cuasi-estáticos.....

1.2.2.1.2	Ensayos dinámicos.....	60
1.2.2.2	Cristalinidad de las películas comestibles.....	60
1.2.2.2.1	Difracción por Rayos X.....	60
1.2.2.3	Contenido de humedad de películas comestibles.....	61
1.2.2.4	Solubilidad en agua.....	62
1.2.2.5	Propiedades sorcionales y de barrera.....	62
1.2.2.5.1	Isotermas de sorción de vapor de agua.....	62
1.2.2.5.2	Permeabilidad al vapor de agua.....	63
1.2.2.5.3	Permeabilidad a los gases.....	66
1.2.2.6	Determinación de sorbato de potasio.....	67
1.2.2.6.1	Determinación de ácido sórbico.....	67
1.2.2.6.2	Técnica empleada para la determinación de ácido sórbico.....	68
1.2.2.6.3	Metodología de la técnica de cuantificación empleada.....	69
1.2.2.7	Atributos de color.....	71
1.2.3	Análisis estadístico de los datos.....	71
1.3	Resultados y discusión.....	73
1.3.1	Propiedades de flujo y deformación de películas comestibles.....	73
1.3.1.1	Ensayos cuasi-estáticos.....	73
1.3.1.2	Ensayos dinámicos.....	75
1.3.2	Cristalinidad de películas comestibles.....	76
1.3.2.1	Difracción de rayos x.....	76
1.3.3	Contenido de sorbato.....	79
1.3.4	Solubilidad.....	80
1.3.5	Propiedades sorcionales y de barrera.....	81

1.3.5.1	Isoterma de sorción de vapor de agua.....	81
1.3.5.2	Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	82
1.3.5.3	Permeabilidad al oxígeno.....	83
1.3.6	Atributos de color.....	85
1.3.7	Conclusiones.....	86

CAPÍTULO 2: LIBERACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SORBATO DE POTASIO SOPORTADO EN PELÍCULAS COMESTIBLES. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE FABRICACIÓN

3.1	Introducción.....	89
2.1.1	Estabilidad microbiológica de los alimentos.....	89
2.1.2	Métodos de preservación de alimentos tradicionales y emergentes.....	90
2.1.2.1	Métodos tradicionales de preservación.....	90
2.1.2.2	Métodos emergentes.....	94
2.1.2.3	Tecnología de factores combinados o de barreras.....	96
2.1.3	Películas comestibles como un factor en combinación.....	96
2.1.3.1	Películas comestibles y el concepto de “envase activo”.....	97
2.1.3.2	Evaluación de efectividad de los antimicrobianos soportados en películas comestibles.....	98
2.1.4	Evaluación de la liberación de sustancias activas.....	99
2.1.4.1	Caracterización de la cinética de liberación de sustancias activas.....	100
2.1.4.2	Caracterización del mecanismo de liberación de sustancias activas.....	103
2.1.5	Evaluación de la actividad antimicrobiana	

de sustancias activas.....	107
2.1.5.1 Ensayos en medio líquido.....	107
2.1.5.2 Ensayos en medio sólido	108
2.1.6 Interacciones biopolímero - sustancia activa. Su efecto en la liberación y biodisponibilidad de sustancias activas.....	109
2.1.6.1 Efecto del método de fabricación empleado en la elaboración de las películas.....	110
2.1.7 Objetivos.....	110
2.2 Materiales y métodos	112
2 Elaboración de las películas.....	112
2.2.1 Evaluación de la liberación del sorbato de potasio soportado en películas comestibles.....	112
2.2.2.1 Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso.....	112
2.2.2.2 Estudio del mecanismo de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso. Propuesta de un modelo matemático.....	114
2.2.2.3 Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio semisólido.....	117
2.2.2.4 Tratamiento matemático de los datos y análisis estadístico.....	119
2.2.3 Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio.....	119
2.2.3.1 Preparación del inóculo.....	120
2.2.3.2 Efectividad del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano.....	120
2.2.3.3 Efectividad de películas conteniendo sorbato de potasio como barrera a la contaminación externa.....	121
2.2.3.4 Recuento de <i>Z.bailii</i>	122

2.2.4	Estudio de la interacción química entre el sorbato de potasio y la matriz amilácea.....	123
2.3	Resultados y discusión.....	124
2.3.1	Evaluación de la liberación del sorbato de potasio soportado en películas comestibles.....	124
2.3.1.1	Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso.....	124
2.3.1.2	Estudio del mecanismo de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso.....	130
2.3.1.3	Cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio semisólido.....	136
2.3.2	Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio soportado en películas comestibles.....	138
2.3.2.1	Efectividad del preservador liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano.....	138
2.3.2.2	Efectividad del sorbato de potasio soportado en las películas como barrera a la contaminación por levaduras.....	143
2.3.3	Conclusiones.....	144

CAPÍTULO 3: MODIFICACIONES EN LA FORMULACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES.

SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SORBATO DE POTASIO Y EN ALGUNAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

3.1	Introducción.....	149
3.1.1	Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los preservadores soportados en películas comestibles.....	149
3.1.1.1	Tipo y cantidad de material empleado en obtener el recubrimiento.....	149
3.1.1.2	Presencia de otros ingredientes.....	150

3.1.1.3	Concentración del antimicrobiano.....	150
3.1.1.4	Condiciones de proceso.....	151
3.1.1.5	Tipo de alimento en contacto con la película.....	151
3.1.1.6	Condiciones de almacenamiento.....	152
3.1.2	Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio.....	153
3.1.2.1	Influencia del pH de las películas.....	153
3.1.2.2	Efecto de la concentración de sorbato de potasio.....	154
3.1.2.3	Efecto de la presencia de lípidos en la formulación de las películas.....	154
3.1.2.4	Efecto del tipo del almidón. Entrecruzamiento.....	155
3.1.3	Objetivos.....	158
3.2	<i>Materiales y métodos</i>	159
3.2.1	Cambios en la formulación de películas comestibles.....	159
3.2.1.1	Cambios de pH y contenido de sorbato de potasio de las películas.....	159
3.2.1.2	Incorporación de aceite de soja.....	160
3.2.1.3	Modificación del almidón de mandioca: entrecruzamiento.....	162
3.2.2	Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio.....	163
3.2.2.1	Preparación del inóculo.....	163
3.2.2.2	Efectividad del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano	164
3.2.2.3	Efectividad de películas conteniendo sorbato de potasio como barrera a la contaminación externa.....	164
3.2.3	Cambios en la formulación de películas comestibles.	

	Su influencia en las propiedades físico-químicas.....	164
3.3	Resultados y discusión.....	166
3.3.1	Cambios en la formulación de películas comestibles.	
	Estudios preliminares.....	166
3.3.1.1	Incorporación de aceite de soja.....	166
3.3.1.2	Entrecruzamiento del almidón de mandioca.....	167
3.3.2	Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento de <i>Z.bailii</i>	171
3.3.2.1	Efecto del cambio del pH y del contenido de sorbato de potasio.....	171
3.3.2.2	Efecto de la incorporación de aceite de soja.....	178
3.3.2.3	Efecto del entrecruzamiento del almidón.....	180
3.3.3	Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio contenido en películas empleadas como barrera a la contaminación por <i>Z.bailii</i> en un alimento modelo semisólido.....	184
3.3.3.1	Efecto del cambio de pH y del contenido de sorbato de potasio.....	184
3.3.3.2	Efecto de la incorporación de aceite de soja.....	187
3.3.3.3	Efecto del entrecruzamiento del almidón.....	187
3.3.4	Cambios en la formulación de películas comestibles.	
	Su influencia en las propiedades físico-químicas.....	188
3.3.4.1	Cristalinidad.....	189
3.3.4.2	Propiedades sorcionales y de barrera.....	190
3.3.4.3	Atributos de color.....	193
3.3.4.4	Contenido de sorbato de potasio.....	193
3.3.5	Conclusiones.....	193

CAPÍTULO 4: APLICACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES A UN ALIMENTO VEGETAL PARA EXTENDER SU VIDA ÚTIL

4.1	Introducción	197
4.1.1	Preservación de productos frutihortícolas.....	197
4.1.1.1	Productos de humedad intermedia.....	197
4.1.1.2	Preservación de frutihortícolas por métodos combinados.....	198
4.1.1.3	Productos mínimamente procesados	200
4.1.1.4	Productos de alta humedad.....	202
4.1.2	El uso de películas comestibles como un factor en combinación.....	203
4.1.3	La calabacita (<i>Cucurbita moschata</i> Duchesne ex Poiret).....	204
4.1.4	Elaboración de un producto dulce obtenido en base a calabacita.....	204
4.1.5	Objetivo.....	205
4.2	Materiales y métodos	206
4.2.1	Preparación de las películas.....	206
4.2.2	Preparación del alimento: calabacita procesada por métodos combinados	206
4.2.2.1	Preparación de la calabacita.....	206
4.2.2.2	Preparación de solución osmótica de glucosa.....	207
4.2.3	Aplicación de la película sobre el alimento.....	207
4.2.4	Evaluación de la estabilidad del producto vegetal.....	208
4.2.4.1	Estabilidad microbiológica.....	208
4.2.4.2	Estabilidad química.....	209
4.2.4.3	Estabilidad organoléptica	209
4.2.4.4	Análisis estadístico.....	210

4.3 Resultados y discusión	211
4.3.1 Preparación de la calabacita procesada.....	211
4.3.1.1 Controles previos al recubrimiento con película comestible.....	211
4.3.2 Evaluación de la estabilidad del producto vegetal.....	211
4.3.2.1 Estabilidad microbiológica.....	211
4.3.2.2 Estabilidad química.....	213
4.3.2.3 Estabilidad organoléptica	215
4.3.3 Conclusiones.....	218
 CONCLUSIONES GENERALES	 219
 REFERENCIAS	 227

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. Películas comestibles. Su aplicación en la conservación de alimentos

Los tratamientos de preservación actualmente en uso para productos alimenticios son variados. Se encuentran las tecnologías tradicionales (i.e.: congelación, deshidratación, esterilización comercial), entre los cuales se destaca la reactivación en la Argentina de la aplicación de una técnica tradicional de preservación, la deshidratación por sublimación en función de los desarrollos del INVAP (<http://www.invap.net/indus/liofilizacion/descrip-e.html>). Otras tecnologías alternativas, aún en proceso de estudio o en incipiente aplicación (i.e.: pulsos eléctricos, altas presiones, pulsos lumínicos, microondas) han comenzado a aplicarse a nivel internacional (Geveke y Brunkhorst, 2003; Hayashi, 2002; Dunn y col., 1989). Las microondas se han estudiado no sólo en relación a la deshidratación de alimentos (Dunn y col., 1989) sino, también, al escaldado de los tejidos vegetales (Andres y col. 2004; Roberts y col., 2004), observándose que la técnica resulta útil para la inactivación de la polifenoloxidasas; sin embargo es necesaria más investigación en los aspectos referentes a sus efectos en los nutrientes y color de los frutihortícolas.

En las últimas décadas se ha tendido al desarrollo de metodologías de preservación de alimentos que resulten menos agresivas de forma tal que los alimentos procesados resulten, al mismo tiempo que inocuos, mejorados en sus características nutricionales y organolépticas. Entre las metodologías propuestas se encuentran las técnicas que combinan distintas formas de estrés microbiano tales como el tratamiento térmico suave, control de pH y de actividad de agua, agregado de preservadores químicos permitidos, uso de películas comestibles, irradiación, tendiendo a la optimización de la calidad de los alimentos (Devece y col., 1999).

Entre las técnicas emergentes para la optimización de la preservación de alimentos surge como novedosa alternativa el empleo de películas comestibles que puedan impartir propiedades funcionales específicas al alimento. Esta técnica responde a:

- el interés de los consumidores en alimentos saludables, de alta calidad, convenientes y seguros.
- la capacidad de estas películas para contribuir a la solución de problemas relacionados con la apariencia, conservación y almacenamiento de ciertos alimentos
- la toma de conciencia colectiva en cuanto al cuidado del medio ambiente, y la necesidad de contar con materiales biodegradables y/o reciclables que reduzcan las consecuencias ambientales de los envases sintéticos.
- la gran disponibilidad, carácter de recurso renovable y costo relativamente bajo de las materias primas utilizadas en su elaboración.

II. Funcionalidad de las películas comestibles

Las películas comestibles no pretenden reemplazar totalmente a los materiales de empaquetamiento tradicionales sino que constituyen uno de los factores posibles a aplicarse en la preservación de alimentos. La utilidad de las películas está basada en su capacidad de aplicarse a un producto alimenticio para optimizar su calidad global, extender su vida útil y, posiblemente mejorar la eficiencia económica de los materiales de empaquetamiento (Kester y Fennema, 1986).

A continuación se detalla una lista de posibles propiedades funcionales de una película comestible, las cuales pueden ayudar a afrontar los desafíos inherentes a la comercialización de alimentos nutritivos, seguros, de alta calidad, estables y económicos:

- **Retardar la migración de humedad:** la velocidad de transferencia de humedad entre un alimento y la atmósfera que lo rodea puede ser reducida si el producto entero es recubierto por una película. Un ejemplo típico es el uso de ceras para recubrir frutas y vegetales (Sümnü y Bayindirli, 1995; Baldwin, 1994). Otra opción, puede ser retardar el transporte de humedad entre componentes del alimento de diferente a_w , colocando un film con buenas propiedades de barrera contra la humedad, en la interfase entre las partes pertinentes (Baker y col., 1994).

- **Retardar el transporte de gases (O_2 , CO_2):** un modo primario de deterioración de muchos alimentos involucra la oxidación de lípidos, vitaminas, componentes del flavor o pigmentos. Tal es el caso de las nueces, las cuales se podrían recubrir con una película impermeable al oxígeno, extendiendo así su vida útil y reduciendo notablemente el costo de materiales externos de empaque, no comestibles (Krochta y col., 1994). También es altamente deseable lograr una cobertura que suprima la respiración aeróbica de frutas frescas y vegetales, de manera análoga a un almacenamiento en atmósfera controlada (Del-Valle y col., 2005; García y col., 1998). De hecho, el uso de una película comestible para reducir la respiración aeróbica tendría una significativa ventaja económica, dado el alto costo asociado con el equipamiento y operación de cámaras de almacenamiento de atmósfera controlada (Park, 2003).

- **Retardar la migración de aceites y grasa:** películas basadas en polímeros hidrofílicos, son altamente impermeables a grasas y aceites. Este es un atributo funcional deseable cuando el alimento esta destinado a ser freído en aceite. La película podría retardar la absorción del aceite hacia el interior del alimento; por lo tanto mejoraría su calidad nutricional y organoléptica (Guilbert y Biquet, 1996).

- **Retardar el transporte de solutos:** las coberturas comestibles pueden mantener una alta concentración de solutos sobre la superficie del alimento. Por

ejemplo, ácido sórbico, retardando el crecimiento microbiano. O también pueden utilizarse para minimizar la difusión de sales dentro del alimento (Torres y col., 1985).

- **Mejorar las propiedades mecánicas frente al manipuleo e Impartir integridad estructural adicional a los alimentos:** el refuerzo de la estructura podría ser impuesto por una película comestible, mejorando la durabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y/o distribución. Las aplicaciones incluyen alimentos congelados, los cuales pueden sufrir fragmentación durante el manipuleo (Baker y col., 1994); o también productos frescos, donde la película puede reducir el daño a las células de la epidermis y así evitar el pardeamiento (Mellenthin y col., 1982).

- **Retener compuestos volátiles del flavor:** Películas comestibles, tales como las compuestas de grasas e hidrocoloides, son frecuentemente usadas para contener agentes de flavor en forma de microcápsulas (Reineccius, 1994).

- **Soportar aditivos alimentarios:** pueden ser usados para incorporar agentes antimicrobianos, antioxidantes, etc. en localizaciones específicas de los alimentos. Así, se puede conseguir exaltar una propiedad funcional en forma localizada sin elevar excesivamente la concentración general del aditivo en el alimento (Guilbert, 1988). Algunos autores rescatan la potencialidad de la liberación prolongada, en el caso del soporte de aditivos antimicrobianos (Buonocore y col., 2003, Chung y col., 2001).

La propiedad fundamental buscada en una aplicación particular dependerá del alimento a recubrir y su modo primario de deterioro.

III. Componentes de las películas

Las películas comestibles pueden prepararse a partir de sustancias alimenticias consideradas como GRAS (“generally recognized as safe” de acuerdo a la legislación norteamericana) tales como proteínas, celulosa y sus derivados, almidón y otros polisacáridos (Guilbert y Biquet, 1996).

Los hidrocoloides pueden ser utilizados cuando el control de la migración del vapor de agua no es el objetivo. Estas películas poseen buenas propiedades de barrera al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos (Greener Donhowe y Fennema, 1994). De acuerdo a su composición pueden clasificarse en carbohidratos y proteínas. Los polisacáridos más utilizados son: celulosa y sus derivados, almidones y derivados, pectinas, extractos de algas marinas (carragenanos, alginatos, agar y furcellaran), gomas (goma arábica, tragacanth, ghatti y caraya), gomas de semilla como algarroba y goma guar, gomas originadas por fermentación microbiana como xántica o gellan y, más recientemente el quitosano, que ha adquirido particular atención por sus propiedades antimicrobianas (Devlieghere y col., 2004; Li y col., 2002).

En cuanto a proteínas, se pueden nombrar (Gennadios y col., 1994): zeína de maíz, gluten de trigo, proteínas de soja y del maní, queratina, colágeno (históricamente para salchichas y productos cárnicos), gelatina, proteínas de la leche (caseína y del suero láctico).

Los sistemas compuestos pueden ser formulados para combinar las ventajas de los lípidos e hidrocoloides y para disminuir las desventajas de cada uno. Cuando una barrera al vapor de agua es deseada, un componente lipídico puede proporcionar esta función (Anker y col., 2002; García y col., 2000) mientras que el componente hidrocoloide provee la durabilidad necesaria. Se han estudiado películas bicapa y multicapas, como así también del tipo conglomerado, en los cuales ambos componentes están intermezclados en la película (Bangyekan y col., 2006).

Entre los lípidos encontramos (Hernandez, 1994): ceras y aceites: parafina, cera carnauba, cera de abejas, cera candelilla, cera polietileno, aceites minerales, ácidos grasos y monoglicéridos.

IV. Formación de las películas

Para la mayoría de las aplicaciones en alimentos, las películas o coberturas son generalmente formadas a partir de una solución o dispersión del agente formador, seguido por alguna forma de separación de este agente del fluido “carrier” (solvente), o bien directamente por solidificación de dicho agente (Greener Donhowe y Fennema, 1994).

- **Coacervación:** involucra separación de material polimérico de una solución ya sea por calentamiento, alteración del pH, adición de solventes o alteración de la carga sobre el polímero involucrado. Puede ser simple o compleja. En la primera, solamente un polímero soluble está involucrado; en la segunda, por lo menos dos macromoléculas de cargas opuestas son combinadas para generar un polímero mezcla insoluble a través del mecanismo de neutralización de cargas.

- **Remoción del solvente:** para obtener una película sólida, la remoción del solvente es una necesidad para aquellos materiales formadores de película dispersos en solución acuosa. La velocidad y la temperatura de secado tienen mucha influencia sobre la cristalinidad y propiedades mecánicas de la película autoportada resultante.

- **Solidificación del fundido:** a través del enfriamiento. Es una técnica común para preparación de películas a partir de lípidos. La velocidad de enfriamiento juega un papel muy importante sobre las propiedades físicas del recubrimiento.

La mayoría de las películas comestibles tienen al menos un componente el cual es un polímero de alto peso molecular. Estructuras poliméricas de cadena larga son

requeridas para obtener una matriz fílmica con apropiada fuerza cohesiva, particularmente si se desea un film que se autosoporte. Esta fuerza cohesiva dependerá de (Kester y Fennema, 1986):

- a) Naturaleza química y estructural del polímero: a medida que aumenta la polaridad y la longitud de la cadena del polímero, la cohesividad se incrementa. También una distribución uniforme de grupos polares a lo largo de la cadena, incrementa la cohesión ya que pueden aumentar los enlaces hidrógeno y las interacciones iónicas.
- b) Naturaleza del solvente utilizado: máxima solvatación y extensión de las moléculas poliméricas conducirán a películas más cohesivas. Los solventes mas utilizados son agua, etanol, o mezcla de ambos.
- c) Presencia de agentes entrecruzados, plastificantes, etc.
- d) Condiciones ambientales durante la formación de la película: las temperaturas excesivas resultan en velocidades de evaporación de solvente muy altas durante el secado, inmovilizando prematuramente las moléculas del polímero antes de que estas tengan oportunidad de asociarse en forma coherente y continua (Arvanitoyannis y col., 1998a). Esto puede llevar a defectos tales como agujeros o espesores no uniformes, que incrementan la permeabilidad.

Una estructura más cohesiva generalmente resulta en películas con flexibilidad, porosidad y permeabilidad a gases, vapores y solutos reducida.

V. Aplicación de las películas sobre el alimento

En el caso de los recubrimientos, alguna de las técnicas arriba mencionadas puede ser utilizada en combinación con una de las siguientes técnicas de aplicación (Grant y Burns, 1994):

- **Inmersión:** utilizado especialmente en alimentos de forma irregular que requieren una cobertura uniforme. Luego de la inmersión, el material excedente se deja drenar del producto, y finalmente se seca o se deja solidificar (lípidos).
- **Spray:** se pueden lograr un espesor más delgado y uniforme que con la técnica anterior. Por otro lado es más adecuado para productos que necesiten ser recubiertos sólo en una de sus caras o en uno de sus lados.
- **Otros:** las coberturas en forma líquida pueden aplicarse con pinceles, cepillos, rodillos, o directamente vertidos sobre la superficie del alimento. En todos los casos se requiere de aplicadores adecuados.

En el caso de desear obtener una película que se autosoporte, por ejemplo para fines de caracterización, existen tres técnicas principales:

- **Casteo (“casting”)**: es simple, permite controlar el espesor del film, ya que se utilizan superficies planas y bien determinadas. Pueden emplearse esparsidores, aplicadores o directamente volcarse.
- **Prensado**: se coloca la suspensión entre dos placas y mediante una prensa se le aplica una dada presión en caliente. Luego se deja enfriar y secar retirando la placa superior.
- **Extrudado**: también ha sido aplicado para obtener películas autoportadas (Delville y col., 2003).

Las películas una vez obtenidas, pueden aplicarse en ciertos alimentos en forma de envoltura. McHugh y Senesi (2000) utilizaron esta técnica con coberturas comestibles elaboradas a partir de puré de manzana para mejorar la calidad y extender la vida útil de rodajas de manzanas frescas.

VI. Películas comestibles como portadoras de aditivos

Las propiedades funcionales, organolépticas, nutricionales y mecánicas de las películas comestibles pueden ser alteradas por la adición de otras sustancias químicas en menor cantidad.

Poliolés como el glicerol, polietilenglicol y sorbitol son comúnmente usados como plastificantes para impartir flexibilidad a la película, pero también modifican sus propiedades de barrera (Yang y Paulson, 2000).

Otros tipos de aditivos pueden ser agentes antimicrobianos, vitaminas, antioxidantes, flavors y pigmentos. Es importante recordar que si bien las películas pueden ser usadas como soporte de aditivos, estos podían alterar la resistencia del film al transporte de vapor de agua, gases o solutos u otras propiedades (Cuppett, 1994).

VII. Aceptabilidad de los alimentos recubiertos con películas comestibles

Como se mencionó anteriormente, las películas comestibles son diseñadas para optimizar la calidad nutricional, organoléptica y microbiológica de los alimentos. Es por ello que los productos recubiertos son sometidos a ensayos de control de calidad, a fin de evaluar la funcionalidad de las coberturas. Entre los ensayos más frecuentemente reportados, a nivel de trabajos de investigación, se pueden mencionar: estudios sobre cambios de color o textura, cambios en la composición, pérdida de peso y evaluación estabilidad microbiológica.

Por otro lado, es de suma utilidad, estudiar las propiedades de las películas autoportadas, con el objeto de caracterizarlas físico-químicamente y en base a esto, poder inferir una óptima aplicación de las mismas. Dentro de esta caracterización son de importancia parámetros tales como los mecánicos estáticos y dinámicos (elongación a ruptura, módulo elástico y de pérdida), permeabilidad al vapor de agua y otros gases como oxígeno y dióxido de carbono, solubilidad, contenido de humedad, digestibilidad, cristalinidad, propiedades termoquímicas, sorcionales, estructurales, de liberación de sustancias activas. También es de importancia evaluar la influencia del tipo y cantidad de aditivos en dichas propiedades (plastificantes, antimicrobianos, antioxidantes).

Sin embargo, la factibilidad de la aplicación de una dada película, estará condicionada, por la aceptación de los consumidores. Tests de aceptación u otro tipo de estudios a nivel sensorial, han sido recientemente reportados y, a modo de ejemplo, se mencionan los siguientes: películas elaboradas a base de una emulsión de cera candelilla y proteínas del suero láctico, fueron evaluadas por un panel entrenado en cuanto a olor a leche, transparencia, opacidad, dulzor y adhesividad (Kim y Ustunol, 2001). Los resultados indicaron que las películas no tenían olor a leche, eran levemente dulces y adhesivas. En otro estudio, mini zanahorias peladas y cubiertas con una película a base de celulosa, fueron testeadas por un panel entrenado en cuanto a cambios de color, decoloración blanca de la superficie, deslizamiento y preferencia global por evaluación de la apariencia bajo luz fluorescente. También se analizaron el aroma a fresco, sabor a fresco, dulzor, dureza, crocancia y preferencia (Howard, 1996). Las zanahorias cubiertas desarrollaron menor decoloración de la superficie, y obtuvieron calificaciones sensoriales más altas para intensidad de color, aroma a fresco, sabor a fresco y aceptabilidad global que las zanahorias no cubiertas. Chien y col. (2005) evaluaron la apariencia visual, dulzor, agriado y aceptabilidad global de rodajas de mango naturales cubiertas con películas a base de quitosano, durante el almacenamiento a 6°C. Los resultados indicaron que las rodajas cubiertas eran aún aceptables luego de 7 días de almacenamiento mientras que el control sin cubrir resultó insatisfactorio. Además, la cobertura no afectó el sabor natural de las rodajas.

VIII. Legislación

De acuerdo a la legislación y etiquetado en los Estados Unidos de América, los recubrimientos y películas comestibles son considerados parte del alimento; en consecuencia, sus ingredientes deben cumplir con lo establecido en el *Code of Federal Regulations* (CFR) y estar declarados en la etiqueta bajo las normas establecidas en la

Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (Franssen y Krochta, 2003). La Unión Europea considera que una película comestible es una parte especial activa del alimento y, desde el punto de vista legal, debe entonces ser considerada como un alimento junto con el alimento envasado en la película y debe cumplir con los requisitos generales exigidos a los alimentos (Fabech y col., 2000). Por otro lado, cada país tiene claras regulaciones referentes a los aditivos alimentarios, las cuales generalmente incluyen requisitos de pureza, metodología analítica, etiquetado y niveles máximos permitidos. Por lo tanto, hasta el momento, bajo esa legislación se debe regular la aplicación de películas comestibles conteniendo aditivos.

OBJETIVOS

Dado que las películas comestibles pueden contribuir a optimizar la seguridad, calidad y vida útil de los alimentos, los objetivos propuestos para esta tesis fueron:

- a nivel general:

- ✓ Profundizar el conocimiento sobre aspectos básicos y aplicados relacionados al desarrollo de películas comestibles
- ✓ Optimizar variables de proceso en la preservación de alimentos
- ✓ Contribuir al desarrollo de alimentos más seguros

- a nivel particular:

- ✓ Desarrollar películas comestibles en base a almidón de mandioca y glicerol, con actividad antimicrobiana para su aplicación en la industria de los alimentos
- ✓ Caracterizar físico-químicamente las películas obtenidas
- ✓ Determinar la relación entre las propiedades físico-químicas y el desempeño de estos materiales
- ✓ Estudiar el comportamiento del sorbato de potasio incorporado a las películas en cuanto a su desempeño como antimicrobiano frente a un microorganismo de prueba como *Zygosaccharomyces bailii*.
- ✓ Evaluar la influencia de la metodología y de la formulación empleada en la elaboración de las películas, en las propiedades de las mismas y en la actividad antimicrobiana del preservador.
- ✓ Estudiar la liberación del sorbato de potasio en medios líquidos y semisólidos
- ✓ Investigar la potencialidad de la aplicación de las películas estudiadas, como un factor adicional de estrés microbiano, para extender la vida de un producto vegetal.

CAPÍTULO 1

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES

INFLUENCIA DEL MÉTODO DE FABRICACIÓN

1.1 **INTRODUCCIÓN**

1.1.1 **Los componentes de las películas comestibles soporte de antimicrobianos**

La formulación básica de las películas comestibles incluye la incorporación de un agente formador de una red tridimensional o matriz capaz de auto-soportarse (biopolímero) que, al mismo tiempo debe ser, preferentemente, translúcida y homogénea. Por otro lado, es necesario el agregado de un agente plastificante que reduzca la rigidez de las películas otorgándoles flexibilidad. Una vez seleccionado el biopolímero y el plastificante, pueden adicionarse otras sustancias, como antimicrobianos, antioxidantes, etc., los cuales se encontraran soportados en la matriz principal.

En esta sección se describirán las características generales del almidón y glicerol, como componentes base de las películas y del antimicrobiano sorbato de potasio incorporado a la formulación.

1.1.1.1 **Almidón como matriz soporte**

1.1.1.1.1 **Consideraciones generales**

Entre los carbohidratos alimenticios, el almidón ocupa un lugar único. Es el más importante material carbohidrato de reserva de muchas plantas superiores y es considerado el segundo biopolímero natural más largo luego de la celulosa (Liu, 2005). La Tabla 1.1 muestra el contenido de almidón de algunas especies vegetales de uso alimenticio.

Tabla 1.1 Componente mayoritarios (% base seca) de algunas especies vegetales de uso alimenticio (Liu, 2005).

	Almidón	Proteínas	Lípidos
Grano de trigo	67	15	2
Arroz pulido	89	8	1
Maíz (kernel)	57	12	7
Grano de sorgo	72	12	4
Papa	75	8	<1
Batata	90	7	<1
Mandioca	90	<1	<1
Leguminosas	42	23	2

Como puede apreciarse, el almidón aparece ampliamente distribuido en el reino vegetal: granos de cereales, semillas leguminosas y tubérculos son las fuentes más importantes. Los almidones contribuyen a las propiedades físico-químicas de los productos alimenticios elaborados en base a cereales, tubérculos, raíces, legumbres y algunas frutas. Es la fuente básica de energía de la mayor parte de la población mundial. En la nutrición humana, el almidón juega un rol importante en el suministro de la energía metabólica que permite al cuerpo llevar a cabo sus diferentes funciones (Brouns y Dye, 2004).

El almidón es también una de las materias primas más importantes de uso industrial (Tabla 1.2). En su estado granular nativo, el almidón tiene limitadas aplicaciones. Sin embargo, empleando modificaciones químicas y físicas, el almidón ha sido aplicado en una amplia variedad de productos industriales incluyendo ingredientes alimenticios, agentes para la industria del papel, textil y de los plásticos.

Tabla 1.2 - Usos industriales del almidón (Liu, 2005)

Industria	Uso del almidón / almidón modificado
Alimentos	Modificadores de la viscosidad, películas comestibles, agentes glaceantes (coberturas)
Adhesivos	Ligante
Papel y cartón	Ligante, coberturas
Textil	Terminación, impresión
Farmacéuticos	Diluyente, ligante, encapsulación de drogas
Aceites	Modificador de la viscosidad
Detergentes	Surfactante, agente de suspensión, agente y activador de blanqueo
Agroquímicos	Cobertura de semillas
Plásticos	Rellenos biodegradables
Cosméticos	Talcos y polvos para el rostro
Purificación	Floculantes
Medicina	Sustitutos del plasma, preservación de órganos para trasplante, absorbente de productos sanitarios

1.1.1.1.2 Química del almidón

La mayoría de los almidones están compuestos mayoritariamente por una mezcla de dos biopolímeros (glucanos): una fracción lineal, la amilosa y una fracción altamente ramificada, la amilopectina. En algunas especies modificadas, los gránulos de almidón

pueden contener cerca del 100% de amilopectina. Además de estos polisacáridos, el almidón puede contener entre 0,5 y 2% m/m de componentes minoritarios como proteínas (0,05 a 0,5% m/m), lípidos (0,1 a 1,7% m/m), sustancias inorgánicas (0,1 a 0,3% m/m de ceniza) y polisacáridos no amiláceos (Liu, 2005).

a) La amilosa

- *Estructura molecular*

La amilosa es esencialmente una macromolécula lineal compuesta por unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Su estructura se aprecia en la Figura 1.1.

unión $\alpha(1 \rightarrow 4)$

GP

Figura 1.1 Estructura molecular de la amilosa

El grado de polimerización (GP) se encuentra entre 100 y 10000. Cada molécula conlleva un extremo reductor (C=O) y un extremo no reductor (-OH). La amilosa de algunos almidones contiene alrededor de 2 a 8 puntos de ramificación por molécula. La longitud de la cadena de estas ramificaciones varía de 4 a 100 GP. En algunas especies vegetales, la amilosa tiene unos pocos grupos fosfato, probablemente en la posición del C-6 de los residuos de glucosa.

- *Propiedades físico-químicas*

La abundancia de grupos hidroxilo a lo largo de las moléculas de amilosa imparte propiedades hidrofílicas a este polímero, dándole gran afinidad por la humedad. Debido a su naturaleza lineal, movilidad y la presencia de muchos grupos hidroxilo a lo largo de las cadenas poliméricas, las moléculas de amilosa tienen tendencia a orientarse entre sí en forma paralela y se aproximan unas a otras lo suficientemente cerca como para permitir la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes. Como

resultado, la afinidad del polímero por el agua a temperatura ambiente es reducida y las soluciones se tornan opacas (Hoseney, 1991).

Actualmente se acepta que la conformación tridimensional más favorable para la amilosa es la de una doble hélice, la cual es capaz de empaquetarse en arreglos regulares (Zobel, 1994). La doble hélice mencionada, puede transformarse en otras diversas conformaciones helicoidales dependiendo de las condiciones dominantes. La interacción de la amilosa y otras sustancias como el yodo, lípidos polares y surfactantes (por ej.: monoglicéridos y ácidos grasos), resulta en la formación de complejos de inclusión. Ya que la amilosa asume una estructura helicoidal, estas sustancias ocupan la cavidad central de la molécula. Las cadenas de monoacilo largas y saturadas forman complejos más estables; los monoglicéridos insaturados tienen una pobre capacidad complejante (Kurtis Villwok y col., 1999).

Muchas de las propiedades físico-químicas de la amilosa, tales como la capacidad de enlace de yoduro y el GP, dependen del origen botánico del almidón y de las condiciones usadas para su fraccionamiento y purificación. Los complejos de inclusión dan un patrón de difracción de rayos X característico y a alto o intermedio contenido de agua, las mediciones por calorimetría diferencial de barrido (DSC) muestran que estos complejos funden a 100-120°C. Dicha transición es reversible ya que los complejos son recuperados luego del enfriamiento. La formación del complejo es dependiente de la longitud de la cadena carbonada de los lípidos y surfactantes, que requieren un mínimo de cuatro a ocho átomos de carbono. La longitud de cadena óptima está entre 12 y 18 carbonos; menos de nueve carbonos dan complejos de baja estabilidad (Kurup, 1992).

b) La amilopectina

- ***Estructura molecular***

La amilopectina es un polisacárido altamente ramificado cuya estructura consiste en residuos de α -D-glucopiranososa unidos principalmente por uniones α (1 \rightarrow 4) como en el caso de la amilosa, pero con una mayor proporción de uniones α (1 \rightarrow 6) localizadas en forma no aleatoria, lo cual le otorga una organización altamente ramificada. En la Figura 1.2 se aprecia un esquema de su estructura.

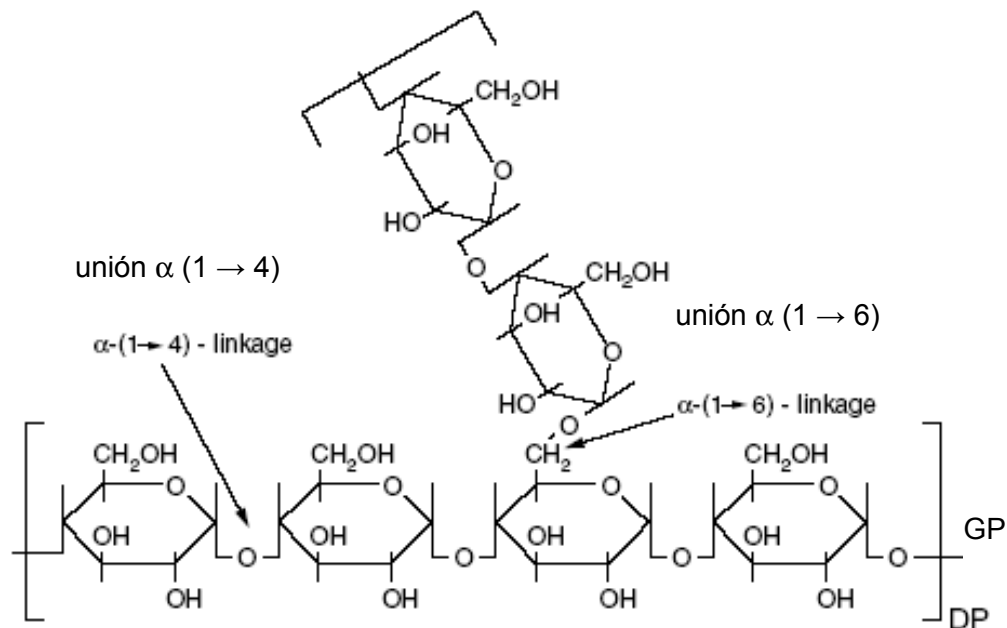


Figura 1.2 Estructura molecular de la amilopectina

La amilopectina es uno de las moléculas biológicas más grandes y su peso molecular va desde 10^6 a 10^9 g / mol, dependiendo del origen botánico del almidón, de su fraccionamiento y del método usado para determinar el peso molecular (Liu, 2005).

b) Propiedades físico-químicas

El mayor tamaño y la naturaleza ramificada de la amilopectina reducen su movilidad en solución y eliminan la posibilidad de niveles significativos de enlaces de hidrógeno intercatenarios. En Promedio, la amilopectina tiene un punto de ramificación cada 20 a 25 residuos de glucosa.

Las cadenas de amilopectina pueden ser clasificadas en tres tipos de acuerdo a su longitud y puntos de ramificación (Figura 1.3). Las más cortas A no poseen puntos de ramificación, las B son ramificadas por cadenas tipo A u otras B (por ejemplo B1, B2 y B3). Las cadenas C soportan a las cadenas B pero contienen el único residuo reductor terminal. Actualmente se acepta que las cadenas ramificadas con un GP de aproximadamente 15 en la amilopectina están en la región cristalina de los gránulos. Estas cadenas cortas forman una estructura de doble hélice ordenada; parte de las dobles hélices pueden empaquetarse en arreglos organizados en forma de conglomerado ("cluster"). Otra característica única de la amilopectina es la presencia de monoésteres fosfato unidos covalentemente tanto en la posición del C-3 como en la del

C-6 de los monómeros de glucosa, y aparecen mayoritariamente en los almidones provenientes de tubérculos (Zobel, 1994).

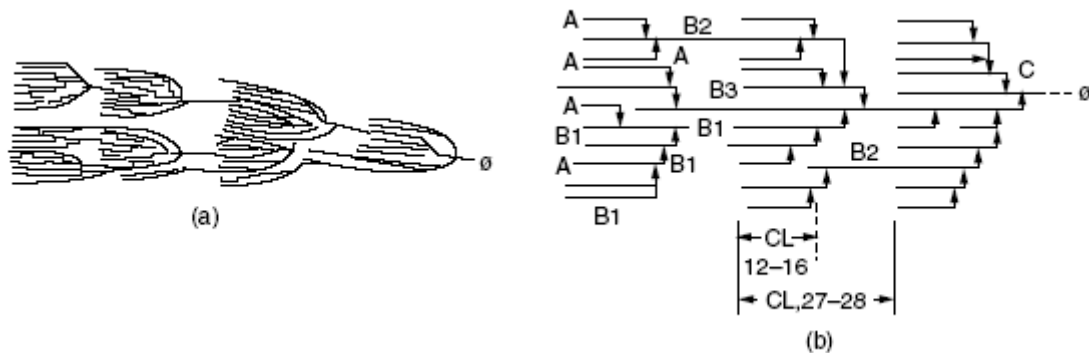


Figura 1.3 Modelos esquemáticos de la molécula de amilopectina (a) French, 1972; (b) Hizukuri, 1986. Ø es el extremo reductor, A, B1, B2, B3 y C son cadenas como se definen en el texto, CL es longitud de la cadena (Liu, 2005).

1.1.1.1.3 Estructura del gránulo

El almidón es depositado en los órganos de las plantas en forma de partículas discretas o gránulos los cuales son relativamente densos, insolubles en agua fría y su tamaño oscila entre 1 y 100 μm dependiendo de la especie de vegetal de origen. Un gránulo típico de almidón de 18 μm de diámetro, consiste en, aproximadamente, un billón de moléculas. En términos moleculares, el gránulo es una estructura inmensa y altamente organizada, consistente de regiones amorfas y cristalinas. Las regiones cristalinas son formadas por las cadenas cortas de amilopectina organizadas en clusters, mientras que las áreas de puntos de ramificación son de carácter amorfo (Figura 1.4). La estructura granular del almidón está esencialmente determinada por factores genéticos que gobiernan su biosíntesis. La presencia de uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ -D en la amilopectina es responsable de la alternancia entre zonas amorfas y cristalinas.

Se ha interpretado que las moléculas de amilosa y amilopectina están distribuidas a través del gránulo y el nivel de enlaces puentes de hidrógeno entre estas moléculas y en la amilopectina misma, es responsable de la heterogeneidad del gránulo. Cuando estos enlaces son estables, numerosos y regulares, las cadenas se asocian como redes cristalinas. Por el contrario, en las áreas amorfas los puentes de hidrógeno son lábiles y esta porción del gránulo es fácilmente distinguible de las zonas cristalinas (Lui, 2005).

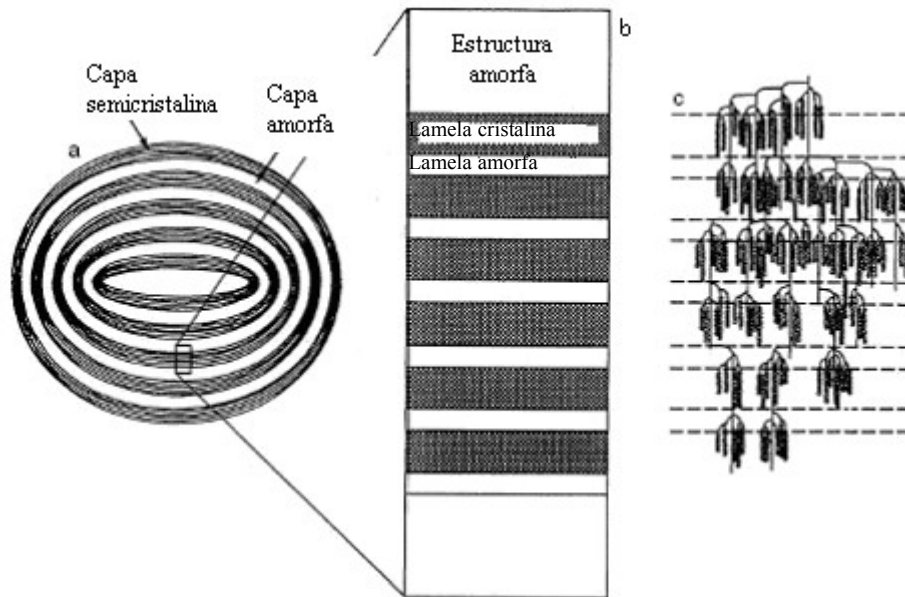


Figura 1.4 Representación esquemática del gránulo de almidón (a) Gránulo simple con capas amorfas y cristalinas alternantes, representando los anillos de crecimiento; (b) vista expandida de una capa semicristalina de un anillo de crecimiento el cual consiste en lamelas cristalinas y amorfas alternantes; (c) estructura tipo racimo de la amilopectina dentro de una capa de crecimiento semicristalina (Liu, 2005).

1.1.1.1.4 Gelatinización del almidón

Cuando los gránulos de almidón son calentados en presencia de suficiente cantidad de agua, una transición de fase (ordenada a desordenada) ocurre. La gelatinización del almidón es el colapso o disrupción del orden dentro de los gránulos. Dicho colapso está acompañado de cambios concomitantes e irreversibles en propiedades tales como hinchamiento granular, fusión de las zonas cristalinas, pérdida de birrefringencia, desarrollo de viscosidad y solubilización. La temperatura de inicio de la gelatinización y el rango sobre el cual ocurre, están gobernados por la concentración del almidón, tipo de gránulo y de la heterogeneidad dentro de la población de gránulos en estudio y, también del método de observación. A altos niveles de humedad, el agua actúa como un solvente y los gránulos se hidratan completamente. La gelatinización es acompañada por el hinchamiento de ambas fases amorfa y cristalina, pérdida de birrefringencia (pérdida de orientación molecular), y pérdida de cristalinidad (pérdida del orden a gran escala y estructura de doble hélice). La ruptura de enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares y enlaces hidrofóbicos del almidón, junto con la formación de enlaces de hidrógeno entre el almidón y el agua, acompañan la transición de fase de la gelatinización (BeMiller y Whistler, 1996).

1.1.1.1.5 Características de las pastas de almidón

Como se mencionó anteriormente, la viscosidad de las dispersiones de almidón tratadas térmicamente está fuertemente influenciada por el hinchamiento de los gránulos. La solubilización de componentes solubles como la amilosa comienza en la región amorfa, el agua difunde primero en el centro de los gránulos y el grado de liberación de la amilosa hacia fuera de los gránulos es bajo. Si existen lípidos en el sistema, se cree que los complejos lípido-amilosa restringen el hinchamiento y la liberación de la amilosa. Una vez que estos complejos se disuelven, la velocidad de liberación de amilosa se incrementa sustancialmente. Cuando la temperatura sube, los gránulos ricos en amilopectina se deforman y pierden su forma original. Se obtiene así una pasta viscosa consistente de una fase continua de amilosa solubilizada y una fase dispersa de gránulos remanentes, principalmente formados por amilopectina. La presencia de amilosa en la fase continua alrededor de los gránulos hinchados resultará en la formación de un gel viscoelástico resistente durante el enfriamiento. Por supuesto, el grado de hinchamiento de los gránulos y la velocidad de formación de gel dependen de la variedad y fuente del almidón, ya que el contenido de amilosa y su peso molecular varía con el origen del almidón (Zobel, 1994).

1.1.1.1.6 Retrogradación del almidón

El término retrogradación del almidón ha sido utilizado para describir los cambios en el comportamiento físico seguidos a la gelatinización. Es éste el proceso que ocurre cuando las moléculas del almidón se reasocian y forman una estructura ordenada, tales como dobles hélices, durante el almacenamiento. En su etapa inicial dos cadenas pueden asociarse para que finalmente, bajo condiciones favorables, un orden cristalino aparezca y ocurra una separación física de fases. En general, la retrogradación tiene lugar en dos etapas: la primera y más rápida es la formación de regiones cristalinas a partir de amilosa retrogradada; la segunda involucra la formación de una estructura ordenada de amilopectina. Durante la retrogradación aparecen interacciones moleculares, principalmente enlaces de hidrógeno entre cadenas de almidón, siendo dichas interacciones dependientes del tiempo y la temperatura.

La retrogradación es importante en el uso industrial del almidón, ya que ésta puede ser un punto final deseado en ciertas aplicaciones, pero puede causar también inestabilidad en las pastas amiláceas. Entre los factores que influyen en la retrogradación se pueden mencionar el origen botánico del almidón (cereal versus tubérculo) y la estructura fina de la amilopectina (longitud de la cadena y distribución).

La relación amilosa / amilopectina afecta la cinética de retrogradación, ya que la amilosa es responsable de los cambios a corto plazo (menores a un día) y la amilopectina es responsable de los cambios reológicos y estructurales de los geles a largo plazo. El contenido de agua en el gel de almidón y la temperatura de almacenamiento pueden afectar la velocidad y extensión de la retrogradación; mientras que ciertos lípidos polares, surfactantes y azúcares pueden retardarla o reducirla. Otros factores a considerar son la concentración del almidón y las condiciones de procesamiento tales como temperatura y agitación (BeMiller y Whistler, 1996).

La gelación como la retrogradación puede ser interpretada como el resultado de dobles hélices formadoras de una red de moléculas interconectadas físicamente. A medida que los puntos de unión iniciales progresan dentro de los segmentos helicoidales y estos se agregan en estructuras cristalinas, los geles o materiales retrogradados se vuelven más rígidos y difíciles de dispersar (Zobel, 1994).

1.1.1.1.7 Almidón de mandioca

- ***Características físico-químicas del almidón de mandioca***

Un reciente estudio de la FAO (2004), destaca que el almidón de mandioca tiene propiedades esenciales que son altamente demandadas por algunas industrias, como la alimenticia y de adhesivos. Dentro de las propiedades que distinguen al almidón de mandioca pueden mencionarse:

- Alta transparencia: muy apropiado para alimentos listos para cocinar y salsas.
- Alta resistencia a los ácidos: buena aplicabilidad para salsas ácidas y mermeladas.
- Alta viscosidad: aplicable para postres, sopas, budines, rellenos y gomas.
- Alto grado de re-humectabilidad: aplicable para estampillas postales, sobres y etiquetas.
- Alto nivel de amilopectina
- Alta pureza: altamente deseable para alimentos dietéticos reducidos en grasa, alimentos libres de gluten y dietas anti-alérgicas debido a la ausencia de gluten, fosfatos, aceites y proteínas.
- Menor temperatura de gelatinización que otros almidones (Tabla 1.3)

Tabla 1.3 Temperaturas de gelatinización del almidón de mandioca y almidones convencionales

Féculas	T° gelatinización
Papa	60 / 65
Mandioca	60 / 65
Maíz ceroso	65 / 70
Maíz	75 / 80
Trigo	80 / 85

- ***La producción mundial***

En el año 2000 la producción mundial de mandioca, alcanzó aproximadamente 200 millones de toneladas. Las estimaciones efectuadas por la FAO, señalan que para el próximo quinquenio se alcanzarán los 210 millones de toneladas de raíces. En el continente africano, con una producción de 86 millones de toneladas en el año 1999, se prevé un incremento de hasta 95 millones para el período 2000/1; se destacan la República Democrática del Congo y Nigeria. En Asia, que produjo en el año 1999, 50 millones de toneladas, se espera un incremento que permitiría alcanzar los 70 millones. Los países productores más importantes son Tailandia e India y, en el continente americano, Brasil, que en el período 1999/2000 tuvo una producción de 31 millones de toneladas. Las estimaciones señalan que dispondría de un aumento superior al 12% para la campaña 2000/1. Estos países concentran el 70% de la producción mundial.

- ***Producción en Argentina***

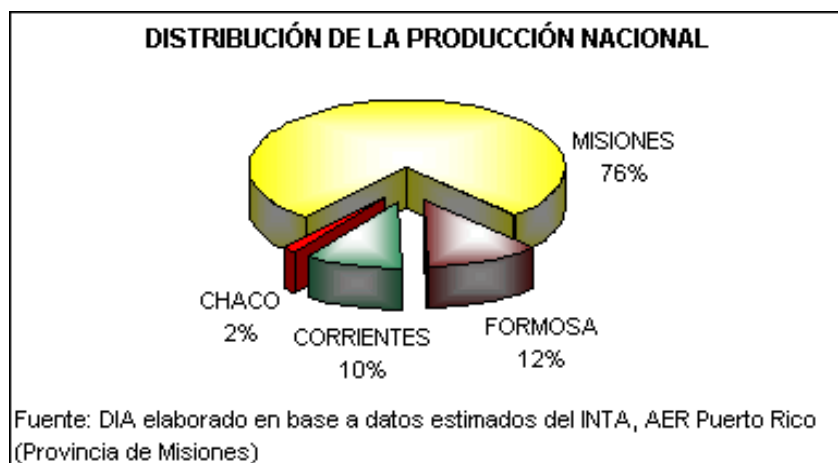
La producción argentina de mandioca alcanzó las 200000 toneladas en el año 2000. Es una actividad desarrollada por los pequeños productores del noreste, región donde el consumo del producto fresco está muy arraigado en la dieta de los colonos. Se convirtió en un aliado insustituible de la industria elaboradora de chacinados, por el principal derivado industrial de la mandioca: la fécula. En particular el uso de almidón de mandioca resulta ventajoso con respecto a otros almidones por su más rápido proceso de gelatinización.

La mandioca se cultiva fundamentalmente en la provincia de Misiones y, en menor medida en Formosa, Corrientes y Chaco (Figura 1.5). En el año 2000, se destinó a la industria el 14% (28000 Ton) de la producción de raíces de la región. En el año 2000 la elaboración nacional de fécula marcó la cifra récord de 7100 ton. Ese año, además, se importaron 2200 toneladas provenientes del mercado externo. En igual período, el

consumo aparente nacional de fécula de mandioca, alcanzó 9.289 toneladas (De Bernardi, 2002).

La fécula es uno de los ingredientes favoritos a la hora de elaborar carnes emulsionadas; grandes cantidades de almidones se utilizan como absorbentes y agentes ligantes de agua, especialmente en la industria del chacinado. Esto se debe a su capacidad para retener la humedad durante el procesamiento de los productos, lo que permite lograr la estabilización de la emulsión en cuanto a humedad, grasa y proteína. Asimismo se usa como un insumo para otras industrias como la de panificados, helados, dulces, jaleas y aderezos.

Figura 1.5 Producción nacional de almidón de mandioca



1.1.1.2 Agentes plastificantes

1.1.1.2.1 Consideraciones generales

Los plastificantes como el glicerol, el sorbitol, diversas ceras o aceites vegetales, son compuestos que se incorporan a las películas con la finalidad de reducir su carácter quebradizo, su dureza e incrementar la flexibilidad y resistencia al corte. Tienen efectos similares sobre otras propiedades físicas ya que reducen efectivamente las fuerzas entre cadenas (Famá, 2004). El plastificante puede ser hidrofóbico o hidrofílico.

Los plastificantes más utilizados en alimentos incluyen:

- Mono-, di-, y oligosacáridos: glucosa, jarabes y miel principalmente.
- Polioles: sorbitol, glicerol, polietilenglicol, propilenglicol, etilenglicol, etc.
- Lípidos y derivados, como ácidos grasos. Monoglicéridos, surfactantes.

La adición de un plastificante generalmente reduce los valores de la transición vítrea del polímero al que se lo incorpora (Bair, 1981).

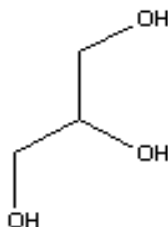
El requisito básico que deben cumplir los plastificantes es la compatibilidad. Éste debe ser miscible con el polímero. Eso implica una similitud en las fuerzas intermoleculares activas en los dos componentes. La plastificación está restringida por compatibilidad limitada de los plastificantes con los polímeros altamente cristalinos.

La eficiencia del plastificante se evalúa por medio de ensayos semi-empíricos. Se puede así, evaluar la viscosidad, a altas diluciones del polímero en el plastificante, las constantes de interacción polímero-solvente medidas en estas soluciones, la disminución de la temperatura de transición vítrea, las propiedades eléctricas o mecánicas.

La selección de un plastificante particular depende de resultados empíricos más que de predicciones teóricas. Todos los plastificantes son de bajo peso molecular, comparado con la del polímero al cual plastifican (Ward, 1985).

1.1.1.2.2 El glicerol

El glicerol es un alcohol polihídrico o polioliol (1,2,3-propanotriol) de 3 átomos de carbono, cuya estructura química se presenta a continuación



Se trata de un líquido viscoso, de sabor dulce, sin olor ni color, completamente soluble en agua y etanol. Otras propiedades físico-químicas del glicerol pueden apreciarse en la Tabla 1.4.

El glicerol está presente en forma de ésteres (glicéridos), en todas las grasas vegetales y animales. Se obtiene comercialmente como un subproducto cuando las grasas y los aceites son hidrolizados para dar ácidos grasos y sus sales (jabones). También es sintetizado a escala comercial a partir del propileno obtenido del craqueo del petróleo.

Gracias a su característica higroscópica (absorbe agua del aire), cumple un importante rol como humectante en muchas industrias, especialmente la farmacéutica y la cosmética (ungüentos y cremas). Como es un líquido de sabor dulce, es usado como agente edulcorante. Su efecto plastificante, lo hace particularmente útil para

optimizar la aplicación de coberturas sobre tabletas, pastillas y comprimidos (David, 1996).

Tabla 1.4 Propiedades físico-químicas del glicerol a 20°C. (David, 1996)

Propiedad	
Masa molar (g/mol)	92,09
pH	5
Viscosidad dinámica (mPa s)	1412
Punto de fusión (°C)	17,8
Punto de ebullición (con descomposición) (°C)	290
Temperatura de ignición (°C)	400
Punto de inflamación (°C)	180
Densidad a 20°C (g/cm ³)	1,26
Presión de vapor a 120°C (hPa)	< 0,001

En la industria alimenticia, el glicerol es un importante agente humectante para productos de panadería. También es agregado a caramelos y congelados para prevenir la cristalización. Es usado como solvente de colorantes alimenticios y como soporte de extractos y agentes saborizantes. La suavidad de las lociones, cremas y pastas de dientes es debida a la presencia de glicerol. El glicerol sorbe agua de su entorno y el calor producido por la absorción aumenta su temperatura. Debido a esta propiedad, se adiciona a adhesivos y pegamentos a fin de evitarles un secado muy rápido. La flexibilidad y maleabilidad del celofán, de papeles de calidad especial, y otros materiales como laminados y juntas pueden ser atribuidas a la presencia del glicerol y su habilidad plastificante. También es importante su uso en la industria de los anticongelantes y selladores. El glicerol es la principal materia prima en la obtención de nitroglicerina, la cual es empleada en la manufactura de dinamita y propelentes. Una gran variedad de mono y diésteres de ácidos grasos superiores son comercialmente elaborados a partir de glicerol. Estos ésteres son comúnmente usados como emulsificantes en la industria alimenticia.

Gracias a la presencia de grupos -OH en su estructura, el glicerol es capaz de vincularse a través de puentes de hidrógeno con las cadenas de almidón, impidiendo el completo ordenamiento de las mismas debido a que se interpone entre éstas. El efecto global del reemplazo de interacciones polímero-polímero por interacciones plastificante-polímero es la reducción de la cristalinidad y, por lo tanto, de la rigidez de las películas. El tamaño molecular, la configuración y el número total de grupos

hidroxilo funcionales del plastificante, como así también su compatibilidad con el polímero, afectan el tipo y cantidad de interacciones entre el plastificante y las cadenas poliméricas (Young y Paulson, 2000).

1.1.1.3 Los antimicrobianos

1.1.1.3.1 Consideraciones generales

Los antimicrobianos alimenticios son compuestos adicionados o presentes en alimentos, que retardan el crecimiento microbiano o destruyen microorganismos. Las funciones de los antimicrobianos son inhibir o inactivar el daño por microorganismos y microorganismos patógenos. La última función ha incrementado en importancia en los pasados 10-15 años ya que la industria de los alimentos procesados requiere más y mejores herramientas para optimizar la seguridad alimentaria (Davidson y Zivanovic, 2003).

Varios compuestos han sido aprobados por agencias reguladoras internacionales para ser usados como antimicrobianos alimenticios directos. Ejemplos de ellos son: parabenos (metil, etil, propil, butil y heptil), ácidos orgánicos y sus sales (acético, láctico, propiónico, benzoico y sórbico), dimetil y dietil bicarbonato, nitritos y nitratos, fosfatos, sulfitos y los naturales nisina, lisozima y natamicina (Davidson y Branen, 1993).

Los preservadores ácidos débiles, que son lipofílicos, inhiben varios procesos metabólicos en las células, particularmente aquellos asociados con el desacoplamiento del sistema de transporte activo necesario en la obtención de energía. Las membranas celulares adaptadas a preservadores se caracterizan por la alteración de su permeabilidad a aniones ácidos, los cuales les permiten mantener un pH intracelular no letal (Warth, 1977).

Entre los conservantes químicos autorizados por el Código Alimentario Argentino (C.A.A., 2006) en la elaboración de diversos alimentos se encuentran el ácido benzoico y sus sales de sodio, calcio y potasio, y el ácido sórbico y sus sales de sodio, calcio y potasio.

El ácido benzoico se usa especialmente como agente micostático. Muchas levaduras y mohos se inhiben a concentraciones de 0,05-0,1% del ácido no disociado, pero la mayor parte de las bacterias causantes de alteraciones son mucho más resistentes y, por lo tanto, no debe confiarse en este ácido para la conservación de alimentos capaces de permitir el crecimiento bacteriano (Chichester y Tanner, 1975).

Uno de los preservadores más ampliamente utilizado en la actualidad es el ácido sórbico y sus sales. Se ha comprobado que poseen un amplio espectro de actividad contra los microorganismos catalasa-positivos, que incluyen las levaduras, mohos y

bacterias, y se los utiliza, por lo tanto, para inhibir los contaminantes aeróbicos en los alimentos fermentados o ácidos, ya que la eficacia máxima de estos conservantes tiene lugar a valores de pH ácidos (Sofos, 1989; Park y Marth, 1972).

1.1.1.3.2 El ácido sórbico y su sal de potasio

a) Descripción y propiedades físicas y químicas

El ácido sórbico (2,4-hexadienoico) y sus sales, son usualmente denominados sorbatos. Constituyen los preservadores de mayor importancia comercial y se los emplea en numerosas áreas, entre las que se encuentran la alimentación humana y animal, las áreas farmacéutica y cosmética. Su utilidad como antimicrobianos depende de sus propiedades químicas, su reactividad, su solubilidad en agua y su estabilidad. Una de las ventajas del sorbato como antimicrobiano es que es considerado como GRAS (“generally recognized as safe”; generalmente reconocido como seguro). Ello se debe a que puede ser metabolizado por el organismo de la misma forma que los ácidos grasos (Sofos, 1989).

El ácido sórbico es un compuesto natural presente en el aceite de serba inmadura. Es un ácido monocarboxílico α - β insaturado de cadena lineal (Figura 1.6), cuya forma comercial corresponde al isómero *trans-trans*. El grupo carboxilo es altamente reactivo, pudiendo formar varias sales y ésteres. Las sales de importancia comercial son el sorbato de calcio, de sodio y de potasio (Sofos, 1989).

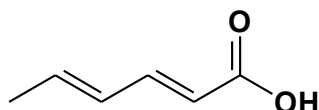


Figura 1.6 Estructura química del ácido sórbico.

En la Tabla 1.5 se detallan las principales propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio, la sal más frecuentemente usada.

El ácido sórbico es arrastrable por vapor, propiedad que es de gran utilidad para su aislamiento e identificación (Lueck, 1976).

Como puede observarse en la Tabla 1.6, el ácido sórbico es más soluble en lípidos que en agua y, a medida que se incrementa el pH de una solución acuosa, la solubilidad del preservador aumenta (Lueck, 1976).

Tabla 1.5 Propiedades físico-químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Propiedad	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Masa molar (g/mol)	112,13	150,22
Punto de inflamación (°C)	126	—
Constante de ionización a 25°C	$1,73 \cdot 10^{-5}$	—
Densidad a 20°C (g/ml)	—	1,36
Rango de fusión (°C)	132 - 137	Descomposición por encima de 270°C
Calor de combustión a 25°C (Btu/lb)	11,927	—
Alcalinidad - acidez	—	1,1 ml de NaOH 0,1N a 0,8 ml de HCl 0,1N por cada 1,1g
Presión de vapor a 20°C (mm Hg)	< 0,001	—
Presión de vapor a 120°C (mm Hg)	10	—
Punto de ebullición a 760 mm Hg (°C)	descomposición	—
Punto de ebullición a 50 mm Hg (°C)	143	—

Tabla 1.6 Solubilidad del ácido sórbico y del sorbato de potasio (% m/m) (Sofos, 1989).

Solvente	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Agua, 20°C (pH 3,1)	0,15	58,20
Agua, 20°C (pH 4,4)	0,22	—
Agua, 20°C (pH 5,9)	1,02	—
Aceite de maíz, 20°C	0,80	0,01
Aceite de soja, 20°C	0,52	—
Sacarosa, 10%	0,15	58,00
Sacarosa, 60%	0,08	28,00
Cloruro de sodio, 5%	0,11	47,00
Cloruro de sodio, 15%	0,04	12,00 - 15,00
Ácido acético glacial	11,50 - 12,30	—
Ácido cítrico, 50%	0,26	—
Ácido láctico, 85,5%	2,26	—
Etanol, 5%	0,16	57,40
Propilenglicol, 20°C	0,20	55,00
Glicerol, 20°C	0,31	0,20

Conocer la solubilidad del ácido sórbico en diferentes solventes permite estimar la forma más adecuada de adicionar el preservador y optimizar la concentración que será retenida en el medio en función de la composición del sistema. Por ejemplo, se sabe que la presencia de macromoléculas como propilenglicol, alginatos, pectinas, mejoran su solubilidad (Campos, 1995).

Las sales del ácido sórbico son solubles en agua, razón por la cual tienen gran aplicación en alimentos. En especial, se utiliza el sorbato de potasio por ser la sal que presenta mayor solubilidad (Tabla 1.7), además de mejores características sensoriales.

Tabla 1.7 Solubilidad de los sorbatos (Sofos, 1989).

Sorbatos	Solubilidad en agua a 20°C (% m/v)
Sorbato de potasio	58
Sorbato de sodio	28 - 32
Sorbato de calcio	1 - 2

b) Estabilidad química

La presencia de dobles enlaces conjugados es una característica que determina el comportamiento químico altamente reactivo del ácido sórbico y sus sales.

Pueden ocurrir distintas reacciones entre los sorbatos y otros componentes presentes en el alimento, las cuales pueden afectar la estabilidad microbiológica y sensorial del producto.

El ácido sórbico reacciona con amonio, alquilaminas, aminas aromáticas y bencilaminas a altas temperaturas (150 - 200°C) (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

En aditivos saborizantes y aromatizantes pueden encontrarse tioles o residuos de péptidos que contengan cisteína, los cuales pueden reaccionar con el ácido sórbico formando compuestos de adición. La presencia de surfactantes (lecitina y Tween 80) o de seroalbúmina bovina actúa catalizando dicha reacción (Wedzicha y Zeb, 1991). En numerosos estudios realizados se encontró que, bajo ciertas condiciones, el ácido sórbico y el nitrito de sodio reaccionan conduciendo a la formación de compuestos con actividad genotóxica sobre las bacterias (Binstok, 1998; Namiki y col., 1983).

c) Acción antimicrobiana

Diversos estudios realizados en todo el mundo han reportado que los sorbatos retrasan el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias. Las concentraciones de sorbato usadas en los alimentos usualmente detienen la actividad microbiana, mientras que niveles más altos pueden causar la muerte celular.

La acción inhibitoria de los sorbatos es generalmente más pronunciada contra levaduras y hongos, comparada con la acción que ejercen sobre las bacterias (Sofos y Busta, 1983). Este hecho se sostiene en que cuando los sorbatos son empleados como agentes fungistáticos se inhibe el crecimiento de un número superior de especies y el alcance inhibitorio es mayor (Sofos, 1989).

- **Modo de acción**

La acción antimicrobiana del ácido sórbico se basa en diversos factores, entre los cuales se pueden citar: inhibición de varias enzimas de la célula microbiana, destrucción parcial de la membrana celular e inhibición de los mecanismos de transporte intracelular, con la consiguiente reducción de los niveles de ATP (Lück y Jager, 2000).

Las enzimas del metabolismo de los carbohidratos, tales como la enolasa y la lactato deshidrogenasa (Azukas, 1962), se ven particularmente afectadas por la acción del ácido sórbico. El preservador también interviene, con relativa actividad aunque no muy específicamente, en el ciclo del ácido cítrico, inhibiendo la malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y aspartasa (York y Vaughn, 1964), entre otras enzimas. Además, el ácido sórbico forma enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilos (SH) de las enzimas mediante sus propios dobles enlaces, siendo así inactivados dichos grupos (Martoadiprawito y Whitaker, 1963). A su vez, se sabe que el ácido sórbico actúa frente a los microorganismos catalasa-positivos, dando cuenta de su influencia sobre la catalasa y la peroxidasa (Lück, 1993). Es poco probable que el efecto inhibitorio del ácido sórbico se deba a la inhibición de una enzima única. Es de destacar que los puntos de ataque en las células bien pueden diferir en bacterias, levaduras y hongos (Liewen y Marth, 1985).

En cuanto a la acción del ácido sórbico sobre la pared celular, la destrucción parcial de la membrana celular incrementa el flujo de protones hacia el interior de la célula, la cual tiene que utilizar una mayor cantidad de energía para contrarrestar las diferencias de potencial que se producen (Eklund, 1980, 1985).

Para que el ácido sórbico sea capaz de desarrollar su acción dentro de la célula microbiana, tiene que penetrar primero a través de la pared celular. Cuando esto sucede, es principalmente el componente ácido no disociado el que entra a la célula. El preservador es más efectivo cuando se encuentra en forma no disociada (constante de disociación, pKa, 4,75). Consecuentemente, es más efectivo en alimentos ácidos,

aunque su acción se manifiesta hasta pH comprendidos entre 6,0 y 6,5, que es superior al rango de actividad de los ácidos propiónico y benzoico (Sofos, 1989).

Algunos microorganismos son capaces de metabolizar el ácido sórbico si se presenta en concentraciones subletales y la población microbiana es abundante. Consecuentemente, el ácido sórbico no es apropiado para la “conservación” de sustratos con alto contenido microbiano, por lo que su uso se limita a conservar alimentos de buena calidad higiénica. Algunos estudios describen la descomposición del ácido sórbico por aspergilos y penicilios (Finol y col., 1982; Kinderlerer y Hatton, 1990).

- ***Espectro de acción***

La acción del ácido sórbico va dirigida fundamentalmente a las levaduras y a los hongos, incluyendo los microorganismos formadores de micotoxinas (Wallhäuber y Lück, 1970). Entre las bacterias, las catalasa-positivas resultan inhibirse más por acción de los sorbatos que las catalasa-negativas y las bacterias estrictamente aeróbicas más que las bacterias ácido lácticas y los clostridios (Lück y Jager, 2000).

- ***Marco regulatorio y aplicación en alimentos***

Tanto el ácido sórbico como su sal de potasio son considerados sustancias inocuas (GRAS: “generally recognized as safe”) para uso en alimentos de acuerdo con la “Food and Drug Administration”, FDA, U.S.A. Actualmente, se observa una tendencia mundial hacia el uso del ácido sórbico en lugar de otros conservantes, menos ensayados, debido a su evaluación como inocuo para la salud (Lück y Jager, 2000). En nuestro país, el C.A.A. (2006) autoriza su empleo en una gran variedad de alimentos.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es la cantidad de un aditivo, agregado a un alimento, que puede ingerir el hombre diariamente, en la dieta, durante toda la vida, sin riesgo para la salud. En el caso del ácido sórbico, la IDA es de 25 mg por kg de peso corporal (FAO/WHO, 1973). Entonces, a modo de ejemplo, para una persona de 70 kg, la IDA de ácido sórbico es de 1750 mg.

- ***Factores que afectan la acción antimicrobiana de los sorbatos***

En general, la acción antimicrobiana de los preservadores está influenciada por numerosos factores, entre los cuales se encuentran:

- factores ambientales, como las condiciones de almacenamiento;
- tipo de proceso de preservación utilizado, es decir: tratamiento térmico, refrigeración, irradiación, etc.;

- factores intrínsecos, como los componentes del alimento, la flora microbiana, la actividad de agua, el pH y la presencia de otros aditivos.

Todos estos factores pueden actuar en forma sinérgica, antagónica o aditiva con los preservadores por lo que resulta difícil estimar o predecir la contribución del preservador en la inhibición de los microorganismos debido a que, en los alimentos, estas interacciones son complejas (Campos, 1995).

En cuanto a la acción antimicrobiana de los sorbatos, los factores más importantes que afectan su efectividad se detallan a continuación.

i) Influencia de los componentes del alimento

La solubilidad, la distribución y la partición de los preservadores en un alimento dependen de la composición del producto, por lo tanto, la acción antimicrobiana se verá afectada por estas propiedades.

En comparación con otros preservadores, los sorbatos poseen un coeficiente de partición lípidos / agua más favorable (más bajo), razón por la cual son empleados en la elaboración de mayonesas, margarinas y aderezos (Sofos, 1989).

La presencia de ácidos en el alimento disminuye la solubilidad en agua de los sorbatos, ya que disminuye la solubilidad del ácido sórbico, pero mejora la capacidad antimicrobiana al aumentar la fracción de ácido no disociado (Castro y col., 2003).

ii) Influencia de la microflora

En general, el tipo y la cantidad de microorganismos presentes en el alimento afectan la capacidad antimicrobiana de los sorbatos. La misma siempre se ve disminuida por altos niveles de contaminación.

Muchas levaduras pueden sobrevivir, adaptarse y crecer en presencia de los niveles máximos de preservadores ácido débiles permitidos en alimentos (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Guerzoni y col., 1990; Warth, 1977). *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de sobrevivir en un medio de pH 4,5 conteniendo un nivel de aproximadamente 0,453 g/L de sorbato de potasio (Cheng y col., 1999).

iii) Influencia de la actividad de agua y de los humectantes

En general, la acción inhibitoria de los antimicrobianos se incrementa si se deprime la actividad de agua del producto. Guerzoni y col. (1990) observaron el incremento significativo de la fase de latencia del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de 200 ppm de benzoato de sodio debido al descenso de la

actividad acuosa de 0,995 a 0,890. La presencia de 25 ppm de ácido sórbico junto con el descenso de la actividad acuosa a 0,93 fueron necesarios para inhibir el crecimiento de la misma levadura (An-Erl King, 1993).

Sin embargo, debe considerarse el efecto “*per se*” de los solutos involucrados. Así, el empleo de solutos como NaCl y sacarosa, puede reducir o aumentar la acción antimicrobiana de los sorbatos. Ellos tienden a reducir la solubilidad del ácido sórbico en agua y elevar el coeficiente de partición lípidos / agua, lo que podría explicar la reducción de la actividad de los sorbatos (Gerschenson y Campos, 1995). Por ejemplo, las células de *Salmonella typhimurium* en un sistema constituido por soja y almidón permanecen viables durante más tiempo a actividad de agua 0,79 que a 0,97 (Beuchat, 1981). El agregado de sacarosa a jugos de fruta conteniendo sorbato de potasio y benzoato de sodio retardó la acción inhibitoria de los mismos frente al crecimiento de levaduras (Beuchat, 1982).

iv) Influencia del pH

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos débiles se incrementa cuando el pH del medio disminuye, y es proporcional a la concentración de la forma no disociada del ácido.

Los sorbatos presentan la ventaja de ser efectivos aún en el rango de pH comprendido entre 6,0 - 6,5, a diferencia de otros preservadores, como el propionato y el benzoato cuyo pH máximo para inhibir el crecimiento microbiano es 5,0 - 5,5 y 4,0 - 4,5, respectivamente (Sofos y Busta, 1981). El sorbato de potasio es inefectivo a pH 7,0 ó mayor (Praphailong y col., 1997).

Batthey y col. (2002) reportaron la existencia de interacciones entre el pH y el benzoato de sodio o el sorbato de potasio, concluyendo que la acidez que poseen las bebidas permitiría utilizar menor cantidad de preservador para inhibir el crecimiento de levaduras.

v) Influencia del grado de disociación

La acción antimicrobiana de un ácido débil depende del grado de disociación del mismo, el cual es función del pH del sistema y está influenciado por la solubilidad en agua y la actividad acuosa. Por ejemplo, a pH 7,0 el porcentaje de ácido sórbico no disociado es 0,6%, mientras que a pH 3,0 es del 98% (Sofos y Busta, 1981). Por ende, para poder predecir la efectividad de un preservador de esta naturaleza en un alimento, se debe conocer el pH del alimento, la solubilidad y la constante de disociación en ese producto en particular.

La información acerca de los valores de la constante de disociación del ácido sórbico en presencia de distintos solutos es limitada, con excepción del caso de soluciones de glicerol - agua (Pethybridge y col., 1983). Sobre la base de los datos reportados, no se observa un gran cambio en el grado de disociación en el rango de actividad de agua entre 0,8 - 1,0.

Algunos estudios han concluido que la forma disociada del ácido tiene capacidad antimicrobiana, pero ésta es de 10 a 600 veces menor que la de la forma no disociada. Sin embargo, a pH 6,0 ó mayor, más del 50% de la acción inhibitoria se debe a la forma disociada (Eklund, 1983).

vi) Influencia de los aditivos

Diferentes estudios indican que los distintos aditivos normalmente incorporados en los alimentos afectan la acción antimicrobiana de los preservadores.

El tipo de ácido agregado, no sólo ejerce su efecto por modificar el pH, sino que también hay una acción específica del anión (Juven, 1976). La inactivación de *Salmonella typhimurium* por acción del sorbato de potasio es mayor en presencia de ácido acético que de láctico (Park y Marth, 1972). En general, los ácidos cítrico y láctico potencian la capacidad antimicrobiana de los sorbatos en mayor medida que otros ácidos (Gerschenson y Campos, 1995).

Para impedir la oxidación de lípidos y el desarrollo de rancidez se adicionan antioxidantes. Los más utilizados son butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, butil-hidroxiquinona, propilgalato. Se encontraron efectos sinérgicos entre estos aditivos y los sorbatos (Robach y Stateler, 1980).

Ciertos estudios indican que la interacción de los sorbatos con los fosfatos mejora la capacidad antimicrobiana de los primeros. Ivey y Robach (1978) reportaron que tanto el pirofosfato ácido de sodio como el hexametáfosfato de sodio mejoran la acción de los sorbatos en la inhibición de *Clostridium botulinum* en carne de cerdo enlatada.

Svorcova (1980) reportó que el ácido sórbico y el ascórbico en combinación resultan más efectivos que cada uno de ellos por separado en la preservación de jugos de frutas.

La resistencia frente al sorbato de potasio de *Zygosaccharomyces rouxii* es mayor en presencia de polietilenglicol que de glucosa (Lenovich y col., 1988).

vii) Influencia del método de preservación empleado

Los preservadores lipofílicos, en conjunto con el tratamiento térmico, pueden afectar la latencia de las esporas, la velocidad y la extensión de la destrucción térmica y la recuperación de las esporas dañadas por acción del calor.

Los ácidos sórbico y benzoico tienen importante influencia sobre la respuesta frente al tratamiento térmico de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces rouxii*. Dicha influencia depende fuertemente del pH del medio (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Guerzoni y col., 1990; Beuchat, 1981). Por ejemplo, luego de un tratamiento a 25°C en presencia de 9 mM de ácido sórbico, *Zygosaccharomyces bailii* incrementa su resistencia frente a un tratamiento a 52°C durante 10 minutos cuando el pH es cercano a la neutralidad, pero a pH 3,5, la termotolerancia se reduce significativamente (Cheng y col., 1999). La presencia de ácido benzoico incrementa la velocidad de inactivación térmica de *Pichia membranifaciens* en jugo de manzana (Veiga y Madeira-Lopes, 2000).

Bajos niveles de sorbatos (0,01%) podrían estimular la ruptura del estado de latencia de las esporas en el transcurso del tratamiento térmico. Este comportamiento se observó en ascosporas de *Byssoschlamys nivea* en jugo de pomelo (Beuchat, 1976).

En general, el tratamiento térmico y los sorbatos actúan sinérgicamente en la inactivación por calor de hongos, levaduras y bacterias (Sofos, 1989).

En algunos estudios se ha sugerido que el uso combinado de bajas dosis de irradiación y la adición de sorbatos, permiten aumentar la vida útil de diversos alimentos ya que ambos factores de preservación actúan sinérgicamente en la inhibición de microorganismos (Sofos, 1989). Sin embargo, debido a que la irradiación y el tratamiento térmico afectan la estabilidad del sorbato, más estudios son necesarios para conocer las ventajas y desventajas de la combinación de estos tratamientos.

viii) Influencia de las condiciones de almacenamiento

Numerosos estudios han demostrado que los sorbatos inhiben a los microorganismos más efectivamente a bajas temperaturas de almacenamiento que a altas (Pederson y col., 1961). La combinación de sorbatos y nitrito posee una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano en salchichas a 7-9°C que a 20°C. Además, la inhibición de la toxina botulínica en homogenatos de cerdo es más pronunciada a 15°C que a 35°C (Roberts y col., 1982).

Campos y col. (2000) observaron que los productos de degradación de sorbato de potasio almacenado a 70°C durante 7 días inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

La acción antimicrobiana de los sorbatos es también influenciada por el tipo de envase y la atmósfera gaseosa que rodea el producto. En general, tanto el envasado como el uso de atmósfera modificada (aumento del nivel de dióxido de carbono) mejoran el efecto inhibitor de los sorbatos. Varios estudios han demostrado que la combinación de dióxido de carbono y sorbatos es una efectiva inhibidora del desarrollo microbiano (Liewen y Marth, 1985).

1.1.2 Caracterización física y química de películas comestibles

1.1.2.1 Reología

Conocer la respuesta de un alimento cuando éste sufre una perturbación, tal como puede ser la aplicación de una fuerza, es de vital importancia a fin de evaluar su comportamiento frente a la preservación, almacenamiento, estibaje, consumo.

Bajo una fuerza aplicada, un material puede fluir o deformarse. El espectro de situaciones posibles es muy amplio. El comportamiento más simple para fluidos, es aquél de los líquidos ideales o Newtonianos. En el extremo opuesto, se encuentran los materiales que no fluyen sino que se deforman elásticamente, como es el caso de los sólidos ideales o Hookeanos. Entre estas dos situaciones extremas ideales, se encuentra el comportamiento viscoelástico correspondiente a sólidos blandos, como es el caso de la mayoría de los alimentos (Aguilera y Stanley, 1999).

La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de los materiales bajo condiciones definidas. Existen numerosos estudios reológicos efectuados en alimentos que muestran la gran diversidad de comportamientos mecánicos que presentan los mismos, directamente ligados a la amplia variación en sus estructuras (Martínez, 2005).

En función de la dirección de la fuerza que se aplica sobre el producto, existen dos tipos de ensayos reológicos: uniaxiales (compresión, tracción o tensión) y tangenciales o de cizallamiento. Con estos ensayos pueden medirse, por ejemplo, la deformación a ruptura, el módulo de elasticidad normal o tangencial, dependiendo del tipo de fuerza aplicada. Además hay ensayos reológicos que resultan ser una combinación de los primeros: flexión, torsión, punción, compresión con desplazamiento lateral.

1.1.2.1.1 Ensayos mecánicos

En la Tabla 1.8 se enumeran los diferentes comportamientos mecánicos asociados al modo en que responde un material cuando es sometido a una dada tensión, la cual luego es removida.

Cuando la tensión aplicada es removida, la respuesta de un sólido ideal es recuperable, instantánea y lineal. Si, en cambio, al remover la tensión el material mantiene una deformación remanente, se habla de un comportamiento plástico. La diferencia entre un comportamiento elástico ideal y uno inelástico lineal, es la pérdida de la condición de instantaneidad en la respuesta, o sea el material vuelve a su estado inicial después de cierto tiempo de removida la tensión aplicada. En cambio, si la evolución conduce a un nuevo valor de equilibrio, se trata de un comportamiento mecánico viscoelástico como es el caso de los materiales poliméricos (Rosenthal, 1999).

Tabla 1.8 Diferentes comportamientos mecánicos (Famá, 2004).

Comportamiento mecánico	Características		
	recuperable	instantáneo	lineal
Elástico ideal	Si	Si	Si
Elástico no lineal	Si	Si	No
Plástico lineal	No	Si	Si
Plástico no lineal	No	Si	No
Inelástico lineal	Si	No	Si
Inelástico no lineal	Si	No	No
Viscoelástico lineal	No	No	Si
Viscoelástico no lineal	No	No	No

El comportamiento mecánico de un material se expresa, generalmente, en términos de una ecuación constitutiva. Es decir, una ecuación en la cual se especifican las propiedades del mismo en forma independiente de su tamaño, dependiendo sólo de sus propiedades físicas.

Conocer el comportamiento mecánico de un material implica, al menos, conocer la dependencia de los módulos elásticos, tangente de pérdida, tensión y deformación a ruptura con las diferentes variables involucradas en su desempeño. Para ello es usual realizar dos tipos de ensayos, los denominados dinámicos y los cuasi-estáticos. En ambos tipos de ensayos, a fin de independizarse de las características geométricas de la muestra a medir, no se trabaja con fuerzas y elongaciones sino que se definen tensiones y deformaciones. Por ejemplo, si es de tracción - compresión, las relaciones de la

tensión con la fuerza aplicada (F) y la deformación con la elongación (Δl) están dadas por:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \text{ec. (1.2.1)} \quad \text{y} \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad \text{ec. (1.2.2)}$$

donde A es el área de la muestra sobre la que está aplicada la fuerza (ancho por espesor), y l_0 es la longitud inicial.

1.1.2.1.2 Estudios dinámicos

El mecanismo de análisis dinámico consiste en aplicarle al material un estímulo sinusoidal. Por ejemplo una deformación dada por:

$$\varepsilon = \varepsilon_0 e^{i\omega t} \quad \text{ec. (1.2.3)}$$

donde ε_0 es la amplitud de deformación, y $\omega = 2\pi\nu$ la velocidad angular de vibración (con ν la frecuencia de vibración).

Cuando el rango de mediciones es tal que la relación *tensión - deformación* es elástica lineal, la respuesta a la deformación entregada será:

$$\sigma = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)} \quad \text{ec. (1.2.4)}$$

donde la frecuencia es la misma que la de la ecuación (1.2.3), σ_0 es la amplitud máxima de tensión y δ , el ángulo de desfase entre la tensión y la deformación al que se lo denomina frecuentemente ángulo de pérdida (Ferry, 1980; Nielsen, 1962).

La tensión se vincula con la deformación aplicada a través de la ley de Hooke modificada, mediante lo que se define como *módulo elástico complejo* E^* . Este parámetro da la medida de cuán elástico es el material (Ferry, 1980) y, en un medio homogéneo, isótropo y lineal, se calcula de la siguiente manera:

$$E^*(\omega) = \frac{\sigma}{\varepsilon} = |E(\omega)| e^{i\delta(\omega)} \quad \text{ec. (1.2.5)}$$

donde $|E(\omega)|$ es el módulo dinámico absoluto. El módulo elástico complejo puede también expresarse como:

$$E^*(\omega) = E' + iE'' \quad \text{ec. (1.2.6)}$$

E' es la parte real del módulo complejo y se lo conoce con el nombre de *módulo de almacenamiento*. Se define como:

$$E' = E * \cos(\delta) \quad \text{ec. (1.2.7)}$$

E'' es la parte compleja y se lo denomina como *módulo de pérdida*. Se define como:

$$E'' = E * \text{sen}(\delta) \quad \text{ec. (1.2.8)}$$

E' cuantifica la energía que es almacenada por el material durante la recepción del estímulo, por ejemplo de compresión y que es liberada, nuevamente, durante la expansión. E'' cuantifica la energía que es disipada o sea, que es provista durante la compresión pero que se pierde, por ejemplo, durante el reordenamiento molecular.

Estas relaciones sólo son utilizadas cuando el material se comporta de forma tal que σ y ε mantienen una relación lineal; lo que implica que E' y E'' son independientes de ε_0 .

Si suponemos que el valor de E' es mucho mayor que el valor de E'' , utilizando las ecuaciones (1.2.5) y (1.2.6), resulta:

$$\sigma = E' \varepsilon \quad \text{ec. (1.2.9)}$$

Reemplazando en la expresión anterior σ por la expresión de la ecuación (1.2.1) y ε por la expresión de la ecuación (1.2.2), obtenemos:

$$F = \frac{E' \Delta l A}{l_0} \quad \text{ec. (1.2.10)}$$

Otra propiedad mecánica dinámica fundamental es la tangente de pérdida, dado que ésta vincula la energía disipada con la energía almacenada. O sea:

$$\tan \delta = \frac{\text{Energía disipada}}{\text{Energía almacenada}}$$

Ello se expresa como:

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'} \quad \text{ec. (1.2.11)}$$

siendo δ el ángulo entre las componentes en fase y fuera de fase de los módulos en el movimiento cíclico (Li y Larock, 2001).

De acuerdo con esta ecuación, sólo dos de los tres parámetros mecánicos dinámicos son independientes. Es decir que, por ejemplo, conocido E'' y $\tan \delta$ el valor de E' sería calculado aplicando la ecuación (1.2.11).

1.1.2.1.3 Estudios cuasi-estáticos

En los ensayos tensión-deformación, a partir de la medición, en general, se evalúa la dependencia de la fuerza con la elongación, cuando la muestra es deformada a una velocidad constante. Estos ensayos son uniaxiales, pudiendo realizarse en modo tracción o en modo compresión, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1.7

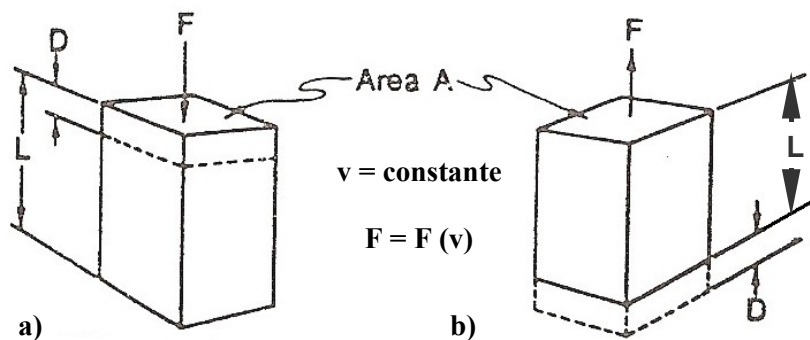


Figura 1.7 Esquema de los ensayos tensión-deformación para los casos: a) compresión; b) tracción. Donde v es la velocidad de deformación, F es la fuerza aplicada, L es la longitud inicial y D es el desplazamiento.

Los parámetros que resultan del ensayo tensión-deformación son: fuerza y elongación. A fin de independizarse de las dimensiones de la probeta, los datos de las curvas experimentales suelen modificarse con una transformación de escala usando las ecuaciones (1.2.1) para la tensión, y (1.2.2) para la deformación, tanto para compresión, como para tracción.

A partir de estas transformaciones, se obtienen las curvas tensión-deformación. La forma de las curvas obtenidas en estos ensayos dependerá de la velocidad de deformación y de la temperatura para un dado producto. En la Figura 1.8 se muestra la variedad de respuesta de los polímeros en ensayos tensión-deformación, efectuados a velocidad de deformación constante.

En los ensayos tensión-deformación los parámetros que generalmente se obtienen son: módulo de Young ($\Delta\sigma/\Delta\varepsilon$), tensión y deformación de fluencia y tensión y deformación de ruptura (Rosenthal, 1999).

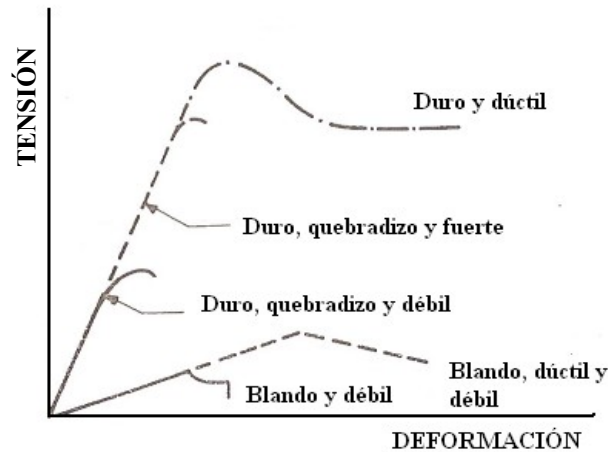


Figura 1.8 Esquemas representativos de los ensayos tensión-deformación para distintos polímeros.

Los geles de almidón pueden ser considerados como polímeros compuestos en los cuales los gránulos (partículas) están implantados y soportados por una ajustada matriz de moléculas de amilosa. Por lo tanto, las propiedades mecánicas de los sistemas almidonáceos están influenciados por las características reológicas de la matriz de gel de amilosa, la fracción volumétrica y la rigidez de los gránulos gelatinizados como así también por las interacciones entre los componentes del almidón. Tamaño y organización física del gránulo, relación amilosa/amilopectina, constituyentes minoritarios (lípidos, fósforo, sales, azúcares), pH, concentración del almidón y regímenes de agitación-tiempo-temperatura, son todos factores importantes que contribuyen a la viscoelasticidad y variabilidad en las respuestas reológicas de los materiales elaborados con almidón (Biliaderis, 1994).

Las películas comestibles estudiadas en el presente trabajo, son esencialmente geles de almidón que han sido plastificados mediante el agregado de glicerol. Es bien conocido que el nivel de retrogradación afecta directamente las propiedades mecánicas, ya que la recristalización involucrada determina un aumento del módulo de Young (Delville y col., 2003).

1.1.2.2 Cristalinidad

1.1.2.2.1 Difracción por Rayos X

Como se mencionó, el almidón es un material semi-cristalino cuya estructura puede ser identificada a través de su patrón de difracción de rayos X. La Figura 1.9

muestra los cuatro principales tipos de patrones de difracción de los almidones nativos: A, B, C y V (Liu, 2005).

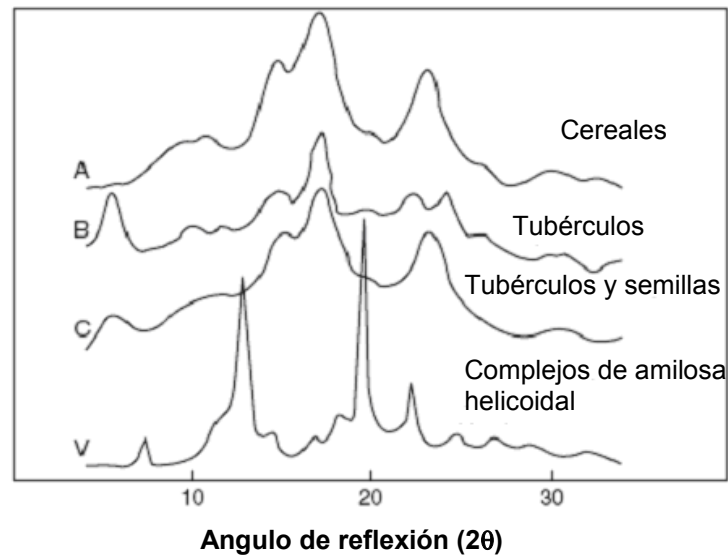


Figura 1.9 Patrones de difracción A, B, C y V de los almidones nativos

1.1.2.2.2 Características de los cristales de almidón

El patrón de difracción de rayos X refleja los diferentes tipos de empaquetamiento de las dobles hélices de la amilopectina. La estructura tipo A tiene un arreglo de dobles hélices densamente empaquetado, mientras que la estructura tipo B consiste de un empaquetamiento más abierto con una mayor cantidad de agua inter-helicoidal (Figura 1.10).

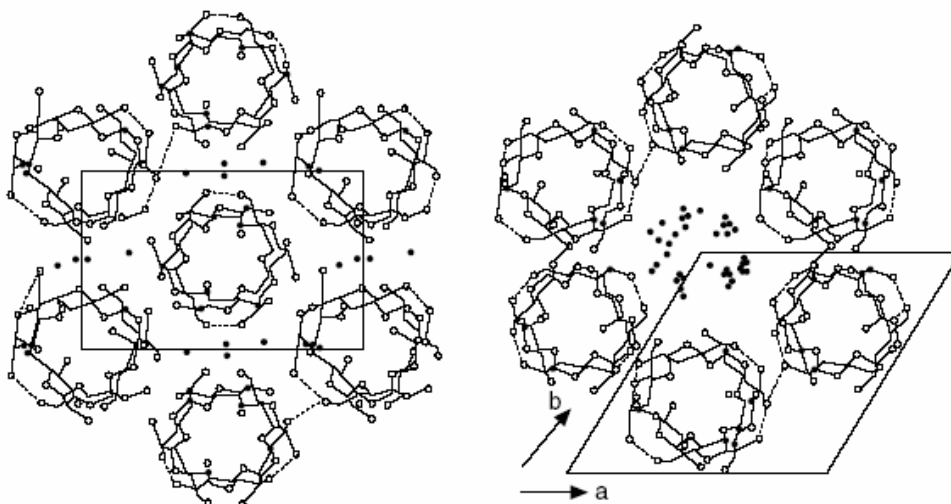


Figura 1.10 Empaquetamientos de las dobles hélices de amilopectina: estructura A (izquierda) y estructura B (derecha).

Las dobles hélices helicoidales en cada estructura son muy similares. Las regiones cristalinas están predominantemente localizadas en las capas duras del gránulo y están compuestas por láminas cristalinas las cuales forman la columna estructural del gránulo.

1.1.2.2.3 Modelo estructural de la celda unidad en almidones tipo A y B

Las primeras estructuras fueron propuestas por Wu y Sarko (1978), las cuales postulan dobles hélices enrolladas paralelamente en el sentido de las agujas del reloj, y empaquetadas en forma hexagonal antiparalela una con respecto a otra (12 residuos). La proyección esquemática del empaquetamiento del arreglo de dobles hélices en los almidones tipo A y B se muestran en la Figura 1.10. La celda unidad para el empaquetamiento tipo A es ortorrómbica, con dimensiones $a = 1,17$ nm, $b = 1,77$ nm y $c = 1,05$ nm, con ocho moléculas de agua por celda. Para la estructura tipo B, el empaquetamiento es hexagonal, con dimensiones para la celda unidad de $a = b = 1,85$ nm, $c = 1,04$ nm, y conteniendo dicha celda 36 moléculas de agua. Además, las hélices en el almidón tipo B están distribuidas alrededor de una columna central de agua, mientras que en el tipo A, el centro es ocupado por otra doble hélice y, en este caso, el agua ocupa espacios entre las hélices.

Posteriores revisiones de estos modelos, revelaron que la estructura tipo A posee una red monoclinica centrada en las caras (grupo espacial B2) con una celda unidad de dimensiones $a = 2,124$ nm, $b = 1,172$ nm y $c = 1,069$ nm. La celda contiene 12 residuos de glucosa en dos dobles hélices enrolladas en el sentido contrario a las agujas del reloj, con cuatro moléculas de agua ubicadas entre las hélices. Las dobles hélices enrolladas paralelas, están también empaquetadas en forma paralela, lo cual resulta en una igualdad de polaridad para todas las cadenas y concuerda con la información biosintética del almidón. Para la estructura tipo B, la versión revisada considera que la celda unidad tiene dos dobles hélices, enrolladas paralelas en el sentido contrario de las agujas del reloj, empaquetadas en forma paralela y sus dimensiones son las mismas que las propuestas por Wu y Sarko. En resumen, la organización tridimensional de las estructuras A y B difieren, pero sus conformaciones moleculares son prácticamente idénticas. Ambas estructuras tienen dobles hélices, la misma quiralidad, enrollamientos paralelos de las hélices y un registro paralelo en su empaquetamiento (Zobel, 1994).

Las características de los diferentes patrones se expresan en los picos más sobresalientes en la difracción de rayos X:

A, muestra 3 importantes picos a 5,8; 5,2 y 3,8 Angstroms (Å). Estos picos corresponden a los $15,3^\circ$, $16,9^\circ$ y $23,9^\circ$ (2θ), respectivamente.

B, muestra picos a 15,8-16,0 Å ($4,0^\circ \cdot 2\theta$); 5,9 Å ($15,0^\circ \cdot 2\theta$); 5,2 Å (mayor intensidad) y un doblete de intensidad media a 4,0 y 3,7 Å ($21,9^\circ$ y $24,0^\circ \cdot 2\theta$ respectivamente).

C, es similar a A con la excepción de la adición de un pico a, aproximadamente, 16,0 Å.

Para la forma V hidratada, aparecen picos a 12,0; 6,8 y 4,4 Å ($8,9^\circ$, $13,0^\circ$ y $20,1^\circ \cdot 2\theta$, respectivamente). La forma deshidratada V, muestra picos d-espaciados de 11,3; 6,5 y 4,3 Å (Fanta y col., 1999; Manzocco y col., 2003).

Las cadenas helicoidales de almidón, empaquetadas en arreglos regulares que determinan la cristalinidad, pueden ser evaluadas a través de difracción de rayos X. En general, los almidones provenientes de tubérculos muestran una estructura cristalina tipo B. La introducción de agentes complejantes en las preparaciones almidonáceas disrumpen la conformación de la doble hélice, ya que estos agentes pueden formar cadenas helicoidales simples de conformación V estable. Esta conformación es el resultado del complejamiento de las moléculas de amilosa con sustancias tales como ácidos grasos alifáticos, surfactantes, emulsificantes, n-alcoholes, glicerol, dimetilsulfoxido entre otras. Cuando amilosa y lípidos polares están presentes, pueden resultar estructuras tipo V pueden resultar del proceso de gelatinización, ya sea durante el calentamiento o durante el enfriamiento (Zobel, 1994).

1.1.2.3 *Propiedades sorcionales y de barrera*

1.1.2.3.1 *Isotermas de sorción de vapor de agua*

El contenido de humedad de equilibrio es el contenido de humedad de un material después de que ha sido expuesto y se ha equilibrado en un medio caracterizado por una dada humedad relativa, H.R. (Brooker y col., 1974). En estas condiciones, el material adquiere un valor de actividad de agua (a_w) cuyo valor coincide con el de la H.R. del medio.

La isoterma de sorción es la curva que indica, en el equilibrio y para una temperatura determinada, la cantidad de agua retenida por un alimento en función de la humedad relativa de la atmósfera que le rodea (Cheftel y col., 1983; Shepherd y Bhardwaj, 1986).

Existen numerosas evidencias de la relación entre el deterioro causado por microorganismos y la presencia de agua. En general, cuanto menor es el contenido de agua de un alimento, tanto mejor resistirá el deterioro causado por microorganismos. Sin embargo, no es simplemente la presencia o no de agua la que decide la intensidad y

rapidez del ataque por parte de los microorganismos: alimentos como la miel, mermeladas, jaleas, etc. y algunos quesos y productos cárnicos que contienen agua en una proporción apreciable, son estables a temperatura ambiente. El factor común es, en este caso, la presencia de grandes concentraciones de solutos en el agua constituyente del alimento, lo que la hace menos disponible para reacciones de deterioro. Existen numerosos estudios de esta problemática, los cuales muestran claramente las relaciones del agua disponible con la vida útil de los alimentos. Las isotermas de sorción de vapor de agua son también herramientas termodinámicas útiles para el estudio del proceso de secado. Ellas permiten determinar interacciones entre el agua y las sustancias osmóticamente activas del alimento y evaluar la estabilidad de este último (Shepherd y Bhardwaj, 1986).

Los requerimientos para el empaquetamiento, así como las características de almacenamiento de los productos desecados pueden ser predichos a partir de su isoterma de sorción. Como la a_w influye en la estabilidad del producto y/o sus características organolépticas, tales como textura, las isotermas de sorción pueden ser usadas para determinar el contenido de humedad óptima de los productos deshidratados (Mir y Nath, 1995).

Las isotermas de sorción también pueden ser usadas para investigar las características estructurales de un producto alimenticio tales como área superficial específica; tamaño, volumen y distribución de poro y cristalinidad en función de la humedad. Tales datos pueden ser usados para seleccionar condiciones apropiadas de almacenamiento y sistemas de empaquetamiento que optimicen o maximicen la retención de aroma, color, textura, nutrientes y estabilidad biológica (Labuza y col., 1972; Rockland y Stewart, 1981; Lazarides y col., 1995).

- **Curva de sorción**

La curva de sorción está compuesta por tres regiones: A, B y C (Figura 1.11). La región A corresponde a la hidratación de la monocapa donde las moléculas de agua están unidas al producto por enlaces tipo puentes de H fuertes. El valor de la humedad de monocapa puede ser determinado, por ejemplo, ajustando los datos de la curva con modelos matemáticos adecuados (Barreiro y col., 2003; Coupland, 2000; Janchud y Chinnan, 1999). La región B corresponde a la parte lineal de la isoterma de sorción. El agua es adsorbida como multicapas de moléculas, unidas a través de enlaces de hidrógeno a la monocapa, o bien atrapadas en el alimento por capilaridad, fuerzas de Wan der Waals, etc. La región C es conocida como la región de agua “libre” o agua en forma de solvente. Aquí, las moléculas de agua están mucho menos fuertemente

enlazadas que en las regiones A y B. Esta fracción de agua esta disponible para el crecimiento de hongos o para la solubilización de solutos (Mathlouthi, 2001).

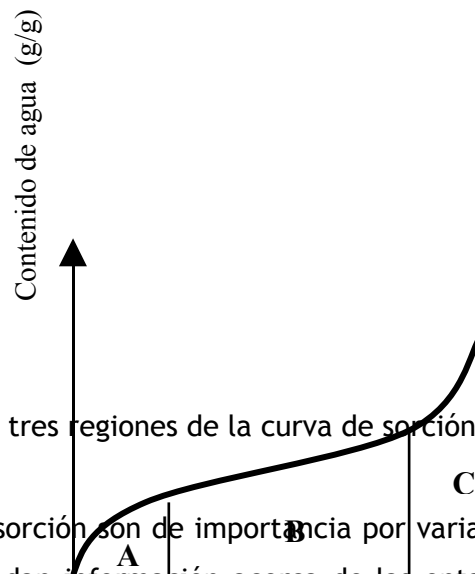


Figura 1.11 Las tres regiones de la curva de sorción de vapor de agua

Las isothermas de sorción son de importancia por varias razones. Desde el punto de vista termodinámico, dan información acerca de las entalpías de sorción y del tipo de enlace de las moléculas de agua a la materia seca. A nivel estructural, pueden ayudar al entendimiento del rol del tamaño de partícula, zonas en estado amorfo o áreas específicas en la sorción de vapor de agua. Desde el aspecto tecnológico, las isothermas de sorción son útiles en la predicción de la vida segura, el control del secado y la prevención de accidentes tales como apelmazamiento y pegajosidad de polvos alimenticios.

- **Modelos matemáticos del comportamiento sorcional**

Numerosos modelos matemáticos han sido propuestos para describir las isothermas de sorción de materiales alimenticios. Tales modelos son muy útiles en el proceso de deshidratación para evaluar la actividad acuosa a alcanzar para asegurar la vida útil del producto, para seleccionar materiales de empaquetamiento, definir las condiciones de almacenamiento, etc. Además las ecuaciones son útiles para elucidar fenómenos termodinámicos. Pero, pocos modelos proporcionan predicciones exactas de datos de sorción de agua en el rango completo de a_w , lo que quiere decir que la sorción es un fenómeno complejo, que involucra muchas interacciones, pudiendo cambiar la naturaleza y mecanismos de las mismas con la composición del material y el contenido de agua (Kinsella y Fox, 1986).

Estos modelos matemáticos de sorción de agua, los cuales incluyen dos o más parámetros, han sido usados para predecir la sorción. Los modelos con más de tres parámetros suelen ser demasiado complicados desde un punto de vista práctico y los

parámetros, de difícil interpretación física (van den Berg y Bruin, 1981). Estos modelos son empíricos, semi-empíricos o teóricos. Así, el modelo de Henderson es empírico, el de Mizrahi es estadístico y el de Oswin está basado en una expansión en serie para curvas sigmoideas. Muchos otros modelos (GAB, BET, Bradley y Halsey) son teóricos y están basados en alguna teoría particular de sorción (Barreiro y col., 2003; Coupland, 2000).

En estos modelos la posible extrapolación no tiene en cuenta los cambios en el mecanismo de sorción de agua y en el comportamiento debido a cambios estructurales y transiciones de fase.

A continuación se muestra la expresión matemática del modelo de Oswin, que será el utilizado para modelar el comportamiento sorcional de las películas estudiadas:

$$m = a \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^n$$

donde m: humedad (g/100 g de base seca), a_w : actividad de agua, a y n, constantes.

1.1.2.3.2 Permeabilidad al vapor de agua

Una de las propiedades más importantes de las películas comestibles es su permeabilidad al vapor de agua (PVA). La presencia de grupos funcionales altamente hidrofílicos, como -OH y -COOCH₃, que fácilmente interaccionan con el agua, genera la absorción de la misma a altas humedades relativas (H.R.). Se ha observado que la influencia de la H.R. en la permeabilidad de películas hidrofílicas es sustancial. La H.R. presenta un efecto exponencial sobre la PVA, por lo que pequeñas diferencias en la H.R. resultan en cambios drásticos en la permeabilidad. La alta solubilidad del agua en estos tipos de polímeros es la responsable de sus elevadas permeabilidades. A su vez, esta absorción disrumpe las interacciones intercatenarias conduciendo a una difusividad incrementada (MacHugh y Krochta, 1994).

Por otro lado, las condiciones asumidas en los ensayos utilizados para evaluar el valor de PVA, no siempre coinciden con las condiciones experimentales reales, conduciendo a errores significativos en las determinaciones y haciendo necesario la aplicación de correcciones (Gennadios y col., 1994).

Los valores de permeabilidad pueden ser empleados para predecir la vida segura de un alimento, como así también para elaborar películas “a medida” en aplicaciones específicas dentro del área de alimentos.

1.1.2.3.3 Permeabilidad a los gases

Los gases permanentes son sustancias que existen en estado gaseoso bajo condiciones estándares de presión y temperatura (0°C y 1 atm). La mayoría de las investigaciones tienden a determinar las permeabilidades al oxígeno y al dióxido de carbono de los recubrimientos comestibles, ya que estas propiedades tienen directa influencia en las velocidades de oxidación y en la respiración de los alimentos que han sido recubiertos (Anker y col., 2001; Krochta, 1994).

La mayoría de los materiales que poseen buenas propiedades de barrera al oxígeno, contiene al menos alguno de los siguientes grupos funcionales: -OH, -CN, -Cl, -F, -COOCH₃. Estas estructuras crean fuertes interacciones entre las cadenas del polímero a través de enlaces de hidrógeno y, por lo tanto, restringen su movilidad (MacHugh y Krochta, 1994).

Los valores de permeabilidad dependen, entre otros, de los siguientes factores: naturaleza química del permeante, naturaleza química del polímero, la estructura y orientación del empaquetamiento de las cadenas, cristalinidad, temperatura de transición vítrea, grado de entrecruzamiento, presencia de plastificantes y/o aditivos y de las condiciones experimentales (MacHugh y Krochta, 1994; Stannett, 1968) .

1.1.2.4 Color

Uno de los principales factores de calidad de un alimento es el color. La percepción del mismo influye críticamente en la valoración de un producto por parte de los consumidores.

Es común en el área de alimentos relacionar el desarrollo de pigmentos pardos con mecanismos de deterioro organoléptico, nutricional o microbiológico.

Cabe aclarar que el pardeamiento puede ser deseable o no, dependiendo del producto final, ya que puede ser el responsable del color y aroma que los caracteriza, como es el caso de la cocción del pan o la carne y la elaboración del dulce de leche. Pero también puede conducir a cambios indeseables como se ha dicho. La calidad nutricional puede afectarse si las reacciones de deterioro involucran azúcares, aminoácidos, proteínas y vitaminas y dan, como productos, compuestos con menor valor nutricional. Además, estas reacciones pueden involucrar a preservadores presentes en el alimento, como el ácido sórbico y/o el bisulfito de sodio, disminuyendo su concentración efectiva, poniendo en riesgo la calidad microbiológica del producto (Lozano, 1978).

En alimentos, pueden ocurrir dos tipos de pardeamiento: uno causado por enzimas y el otro, a través de reacciones químicas como, por ejemplo, las del tipo Maillard. La extensión del desarrollo de pigmentos pardos, depende del pH, la temperatura, la actividad de agua y de la formulación del producto (Cheftel y Cheftel, 1983).

El pardeamiento enzimático ocurre por acción de la enzima polifenoloxidasas, ampliamente distribuida en la naturaleza, sobre compuestos fenólicos. Esta enzima cataliza reacciones oxidativas generando *o*-quinonas, las cuales interactúan para formar compuestos pardos poliméricos (Lozano, 1978).

El pardeamiento no enzimático es causado principalmente por reacciones de Maillard, caramelización, destrucción de ácido ascórbico y destrucción de ácido sórbico. En el primer caso intervienen aldehídos, cetonas y azúcares reductores los cuales reaccionan con aminas, aminoácidos, péptidos y proteínas. Estos compuestos pueden estar presentes en el alimento, por ejemplo, los azúcares o el ácido ascórbico, o pueden ser potencialmente generados en el mismo, como ocurre durante la degradación del ácido sórbico, la hidrólisis de disacáridos, la oxidación de lípidos y la oxidación de alcoholes y polifenoles. Dichas reacciones generan, carbonilos que pueden dar origen a pigmentos pardos solubles en agua, los cuales se combinan y entrelazan con proteínas produciendo melanoidinas insolubles en agua (Knerr y col., 2001).

La caramelización involucra una serie de reacciones en cadena que parten de un equilibrio entre las formas anoméricas y acíclicas de los azúcares. A partir de la forma acíclica se producen reacciones de enolización, de isomerización y de deshidratación, dando lugar a la formación de compuestos pardos. Las elevadas temperaturas (cocción de alimentos), favorecen el desarrollo de estas reacciones (Braverman, 1967).

El ácido ascórbico, en concentraciones elevadas, como por ejemplo, las presentes en jugos cítricos, sufre degradaciones oxidativas y no oxidativas. El oxígeno, si bien influye en todas las reacciones de pardeamiento no enzimático, tiene un papel preponderante en esta reacción. También son de consideración la presencia de trazas de metales, como el cobre; del ácido cítrico; los aminoácidos y algunos azúcares, como la fructosa y la glucosa (Rojas, 1995). La degradación del ácido ascórbico se inicia con el equilibrio entre la forma cíclica y acíclica del ácido, asemejándose a una reacción de caramelización rápida.

En el caso del ácido sórbico, empleado como preservador en un alimento, puede sufrir reacciones de autooxidación produciendo malonaldehído, compuesto intermediario muy reactivo en las reacciones de pardeamiento (efecto acelerador). Algunos compuestos como el glicerol, aceleran la formación de compuestos pardos en

presencia de ácido sórbico (Campos y col., 1997; Thakur y Arya, 1991), mientras que elementos como Co^{+2} inhiben la autooxidación (Seow y Cheah, 1985). La degradación del ácido sórbico, no sólo es perjudicial desde el punto de vista sensorial, sino también desde el punto de vista de la estabilidad microbiológica, ya que puede conducir a concentraciones no efectivas del preservador.

1.1.2.4.1 Percepción del color

La percepción del color de un objeto es un fenómeno complejo en el cual intervienen factores como:

- La distribución de la energía espectral del iluminante, es decir, la clase de luz que ilumina al objeto: solar, luz de lámpara de tungsteno o mercurio, etc.
- Las condiciones bajo las cuales el color es visto, tales como: el ángulo de visión, el color del contorno, la extensión de la zona coloreada, el nivel de iluminación.
- La sensibilidad del observador.
- Las características espectrales del objeto con respecto a la absorción, reflexión y transmisión de la luz (atributos geométricos).

En términos ópticos, los objetos pueden clasificarse en (Joshi y Brimelow, 2002):

- a) Opacos: no transmiten la luz ya que absorben y/o reflejan toda la luz del espectro visible, presentando un brillo blanco.
- b) Metálico: reflejan la luz a una longitud de onda dominante, presentando un brillo coloreado.
- c) Transparentes: la mayor parte de la luz se transmite sin reflejarse ni difundirse.
- d) Translúcidos: parte de la luz es reflejada y parte transmitida, dando lugar a una importante componente difusa tanto transmitida como reflejada.

1.1.2.4.2 Atributos de color

La claridad es el atributo que hace corresponder a cada color una equivalencia con respecto a una escala de grises. A la cualidad psicológica claridad le corresponde la magnitud psicofísica luminosidad. El tono o matiz es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, naranja, amarillo, verde, azul, púrpura o cualquier combinación de ellos. A la cualidad psicológica tono le corresponde la magnitud psicofísica longitud de onda dominante. La saturación es el atributo que, fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro, cuanto más parecido a este, tanto más saturado. A la cualidad psicológica saturación le corresponde la magnitud psicofísica pureza (Penfield y Campbell, 1990). De esta manera, el color puede ser descrito en

función de estos tres atributos, los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de los métodos cuantitativos para la determinación del color.

1.1.2.4.3 Medición instrumental del color

Una de las bases fundamentales de la colorimetría triestímulo establece que cualquier color puede ser igualado por la suma de tres colores primarios en cantidades convenientes (Leyes de Grassman).

Estos colores primarios deben ser elegidos de tal forma que sean independientes entre sí, esto es, ninguno puede ser obtenido por alguna combinación de los otros dos. En la práctica, los colores primarios para utilizar en forma aditiva son tres: rojo, verde y azul. La suma de todos ellos produce la sensación de luz blanca o acromática.

De los sistemas propuestos para la especificación del color el más difundido universalmente es el de la CIE (Comisión Internationale de l'Eclairage), en el cual el color es indicado por tres variables X, Y, Z, conocidas como los valores triestímulo y que representan a tres colores primarios imaginarios.

Para normalizar este método de medida se define al "observador patrón", como representativo de un observador de visión normal, y se asigna a cada color un conjunto de tres valores, índices de la contribución de cada uno de los primarios imaginarios. Sin embargo, estos colores reales se convirtieron matemáticamente en estímulos de referencia X, Y y Z, que resultaron más convenientes desde el punto de vista del cálculo. Si tomamos los datos del rojo, verde y azul para los colores espectrales, los transformamos en coordenadas X, Y y Z y representamos la respuesta del ojo humano para estos colores en función de la longitud de onda, tenemos la función de distribución de los tres primarios para el observador patrón, considerada como la respuesta del ojo humano. Estas curvas se estandarizaron en 1931, y se llamaron curvas del observador patrón CIE x,y,z.

En la especificación de un color es necesario considerar a) el factor de transmitancia o reflectancia espectral del objeto en función de la longitud de onda, b) la distribución energética de la luz incidente o iluminante para cada longitud de onda y c) el análisis por el sistema visual de acuerdo a los tres primarios elegidos, o curva del observador patrón, todos ellos en función de la longitud de onda.

El factor de transmitancia o reflectancia espectral se obtiene mediante un espectrofotómetro, en el que se determina la luz transmitida o reflejada para cada λ .

La medida objetiva del color de un material puede obtenerse del análisis de su espectro visible, por transmisión o reflexión, obtenido con un espectrofotómetro.

La distribución energética de diversos iluminantes es conocida. Para comparaciones estándar la CIE ha establecido fuentes de luz estándar: Iluminante A tiene una distribución energética similar a la luz emitida por una lámpara incandescente de tungsteno; el iluminante B corresponde a la luz solar con componente de cielo a medio día; el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto); el iluminante D corresponde a la irradiación solar directa. La elección del iluminante dependerá de las condiciones en las que normalmente se observa el objeto a estudiar.

Otra de las variables a fijar es el ángulo de observador o campo visual: cuando se miran objetos la información general proviene de ángulos de 10 - 20°, pero cuando se miran detalles el ángulo es de 2°; en general, en colorimetría de alimentos se emplea este último.

El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza de la siguiente manera: el espectro de la muestra (R vs λ) se multiplica por el espectro de la luz incidente (E vs λ). La función resultante se combina con las funciones de distribución de cada uno de los tres primarios imaginarios (x , y , z) y el área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales (X , Y , Z) al color dado.

En los espectrofotómetros actuales, el cálculo para obtener los valores de X , Y , Z es hecho automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento.

De esta manera el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X , Y , Z .

Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas x , y definidas como:

$$x = \frac{X}{(X + Y + Z)} \qquad y = \frac{Y}{(X + Y + Z)}$$

El color definido por (x,y) se representa en el diagrama cromático CIE donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa es necesario agregar el valor de Y , en un plano perpendicular al plano del papel, que por sus características de cálculo representa la propiedad de reflejar más o menos la luz y es conocido como la luminosidad o la claridad del color.

En la Figura 1.12 está representado el llamado diagrama cromático CIE, en el que se delimita el plano de las coordenadas cromáticas con la línea de los colores espectrales, cerrada por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras.

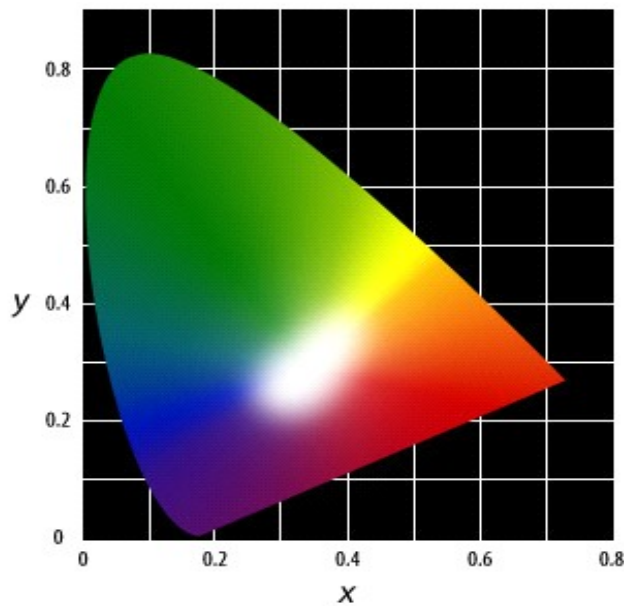


Figura 1.12 Diagrama cromático CIE

La longitud de onda dominante (tono) se obtiene gráficamente, conocidas las coordenadas cromáticas del color, uniendo el punto que las representa con el punto correspondiente a las coordenadas cromáticas del iluminante, prolongando esta recta hasta que corte la línea de los colores espectrales; el punto en que la corta representa la longitud de onda dominante.

La pureza (saturación) es la distancia relativa desde la línea blanca, y está relacionada con la saturación.

Si el color está situado sobre la línea de colores espectrales, su pureza es 1 (uno).

Se puede calcular la pureza de un color como:

$$P = \frac{x - x_w}{x_p - x_w}$$

donde x es la coordenada cromática del color, x_w es la coordenada cromática de la fuente y x_p es la coordenada cromática del color puro espectral.

Esta ecuación puede ser de utilidad para definir índices de color (índice de blancura, de amarillo, de rojo, etc.).

Los espectrofotómetros de reflectancia tienen la ventaja de ser más precisos y de realizar la medición de reflectancia o transmitancia (según donde se coloque la muestra) a

medida que barren las distintas λ y luego realizan la integral para todas las λ automáticamente.

Para realizar la medición objetiva del color con estos instrumentos se requiere decidir previamente cómo será la presentación de la muestra (cubeta, posición, tipo de medición; si por reflectancia o por transmitancia):

En muestras opacas los valores triestímulo dependen directamente de la reflectancia del material.

Las muestras transparentes (jugos de manzana, extractos, vinos, etc.) se puede medir por reflectancia en cubetas transparentes con un fondo blanco y hallar la diferencia de color con respecto al fondo elegido. Es importante tener en cuenta que, sobre fondo negro la sensibilidad es mucho menor (Lozano, 1978).

1.1.2.4.4 Cálculo de algunas funciones de color

Las funciones de color son valores que se obtienen por combinación matemática de los valores triestímulo, y que representan los atributos de color, según los distintos espacios cromáticos. Para describir un cambio de color se debe primero seleccionar la función más adecuada para ello, que es la que representa más sensiblemente la respuesta al cambio realizado en el producto (por ejemplo, pérdida o formación de pigmento).

- **Escala Hunter (Lab)**

Esta escala representa la aproximación matemática de la respuesta del ojo al blanco-negro, rojo-verde y amarillo-azul. La relación entre esta escala y los valores triestímulo de la escala CIE se expresan a continuación:

$$\begin{aligned}L &= 100 (Y/Y_0)^{1/2} \\a &= 175 (Y/Y_0)^{1/2} [(X/X_0) - (Y/Y_0)] \\b &= 70 (Y/Y_0)^{1/2} [(Y/Y_0) - (Z/Z_0)]\end{aligned}$$

donde Y_0 , X_0 , y Z_0 corresponden a los valores triestímulo de un objeto blanco patrón, bajo condiciones específicas de iluminante y observador.

Los ejes L, a y b son mutuamente perpendiculares. Un incremento en el valor negativo de a representa un incremento en la componente verde del color. Un incremento en a positivo representa un incremento en el rojo. Un incremento en -b, un incremento en el azul y en +b, un incremento en el amarillo. Un aumento de L (L = 0, negro a L = 100, blanco), significa un incremento en la luminosidad. Cuando a y b igualan a cero, el espécimen se encuentra en el eje L (blanco-negro), o sea representa algún valor en la escala de grises.

- **Indice de amarillo**

De acuerdo a la norma ASTM D-1925 (1988), se define índice de amarillo (Yellow index, YI) como:

$$YI = \frac{100}{Y}(1,2769X - 1,0592Z)$$

donde X, Y y Z corresponden a los valores triestímulo del espécimen bajo condiciones de iluminante C y observador 2°.

Un valor positivo de YI describe la presencia y magnitud de un componente amarillo, mientras que un valor negativo indica la aparición de un componente azul.

Esta ecuación fue, en principio, desarrollada para determinar el grado de color amarillo de ciertos plásticos transparentes no coloreados, plásticos translúcidos u opacos casi blancos.

1.1.3 ***Influencia del método de fabricación en las películas comestibles***

De acuerdo a la bibliografía, el desempeño de las películas no solo depende de su composición, sino también de la técnica utilizada para su obtención. Arvanitoyannis y col. (1998a, b) reportaron que el método de secado a baja temperatura (20°C) de películas elaboradas con almidón hidroxipropilado y gelatina, condujo al desarrollo de mayor porcentaje de cristalinidad y a una disminución de la permeabilidad al CO₂ de uno a dos órdenes, comparado con las películas elaboradas con casteo a 60°C (secado rápido). Por otro lado, Cha y col., (2003) y Dawson y col. (2003) determinaron que la liberación de nisina a partir de películas de base proteica dependía del método de obtención, ya sea por prensado en caliente o por casteo. En otro estudio (Jangchud y Chinnan, 1999) se investigó el efecto de la temperatura del secado (70, 80 o 90°C) de películas elaboradas con una solución concentrada de proteínas del maní y se observó que, a mayor temperatura de secado, incrementaban la fuerza tensora y la elongación pero disminuían la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno. Las condiciones de elaboración de la suspensión inicial formadora de películas también influyen en las propiedades físico-químicas de las películas resultantes. Por ejemplo, cuando soluciones de gluten de trigo fueron elaboradas a distintas temperaturas, se observó una disminución de la solubilidad de las correspondientes películas en agua, a medida que la temperatura utilizada en el calentamiento de la solución de partida aumentaba de 55 a 95°C (Roy y col., 1999).

Interesantes observaciones fueron realizadas por Rindlav y col. (1997), quienes reportaron que el grado de cristalinidad de películas comestibles elaboradas con almidón de papa fue dependiente de las condiciones de secado: temperatura, humedad del aire y tiempo transcurrido desde que el gel obtenido se transforma en película. Los mismos autores, también observaron que estos cambios en la cristalinidad afectaron las propiedades mecánicas de películas a base de amilopectina, pero sin embargo no influenciaron sus características de permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (Rindlav-Westling y col., 1998).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el estudio de las propiedades físico-químicas y mecánicas de las películas comestibles en relación a su composición y condiciones de elaboración, es considerado de suma importancia debido a la necesidad de contar con una completa caracterización de las coberturas a fin de evaluar ventajas y desventajas de su potencial aplicación en la preservación de alimentos.

1.1.4 Objetivos

Esta primer parte de la tesis, tuvo los siguientes objetivos:

- ✓ Desarrollar métodos de fabricación de películas comestibles a base de almidón de mandioca, plastificadas con glicerol y portadoras de antimicrobianos (sorbato de potasio)
- ✓ Caracterizar físico-químicamente las películas comestibles desarrolladas
- ✓ Evaluar la influencia de la técnica de fabricación en las propiedades físico-químicas de las películas, con especial referencia al efecto del procedimiento de gelatinización y secado aplicado
- ✓ Contribuir al conocimiento sobre la influencia del método de elaboración en el desempeño y aceptabilidad de las películas.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Métodos de elaboración de películas comestibles

1.2.1.1 Formulación de las películas

Como se mencionó en la sección introductoria, la formulación de las películas comestibles contempla dos sustancias básicas: un hidrocoloide o biopolímero formador de una red tridimensional o matriz soporte y un agente plastificante que otorgue elasticidad a las películas evitando que resulten rígidas y quebradizas. Además se propuso el empleo de un almidón de origen local a fin de contribuir a promover su producción e industrialización y al aumento de su valor agregado.

- **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica, a excepción del almidón que fue de grado alimenticio.

- Fécula de mandioca (Industrias del Maíz S.A., Bernesa S.A., Argentina)
- Glicerol (Mallickrodt, Argentina)
- Sorbato de potasio (Sigma, St Louis, Missouri, USA)

1.2.1.2 Métodos de elaboración

Se prepararon mezclas de almidón de mandioca, glicerol y agua con las siguientes proporciones: 5,0 : 2,5 : 92,5 en peso, o bien de almidón de mandioca, glicerol, sorbato de potasio y agua: 5,0 : 2,5 : 0,3 : 92,2 en peso. Estas suspensiones de almidón se agitaron durante 45 minutos a fin de favorecer la dispersión y humectación de los gránulos previo al tratamiento térmico.

A continuación se practicaron distintos métodos de elaboración de películas según:

a) **Método 1:** calentamiento de 300 g de mezcla, sobre agitador magnético provisto con platina calefactora, a una velocidad inicial de 1,6°C/min durante aproximadamente 25 minutos, momento en el cual el sistema entra en su etapa de gelatinización (aproximadamente a los 70°C). Posteriormente, el calentamiento fue mantenido a una baja velocidad de calentamiento ($\cong 0,3^\circ\text{C}/\text{min}$) por un período adicional de 40 minutos (Figura 1.6 panel a). Luego de la gelatinización, la soluciones formadoras de película fueron vertidas sobre placas de petri de vidrio (5 cm de diámetro) y secadas a 50°C (H.R. $\cong 20-22,5\%$), por dos horas. El secado fue completado en una cámara de temperatura controlada (Velp, Italia) a 25°C y H.R. $\cong 80-90\%$ durante una semana.

b) **Método 2:** calentamiento de 300 g de mezcla, sobre agitador magnético provisto con platina calefactora, a una velocidad constante de $1,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante aproximadamente 30 minutos (Figura 1.6 panel b). En este caso, pudo ser visualmente apreciado que la gelatinización del almidón comenzaba también a una temperatura de aproximadamente 70°C . Luego de la gelatinización, la soluciones formadoras de película fueron vertidas sobre placas de petri de vidrio y secadas a 50°C (H.R. $\cong 20-22,5\%$), por dos horas. El secado fue completado en una cámara de temperatura controlada (Velp, Italia) a 25°C y H.R. $\cong 80-90\%$ durante una semana.

c) **Método 3:** calentamiento de 300 g de mezcla, sobre agitador magnético provisto con platina calefactora, a una velocidad constante de $1,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante aproximadamente 30 min (Figura 1.6 panel b). Luego de la gelatinización, la soluciones formadoras de película fueron vertidas sobre placas de petri de vidrio y secadas a 50°C (H.R. $\cong 20-22,5\%$), por dos horas. El secado fue completado dentro de un desecador, al vacío y sobre CaCl_2 (H.R. $\cong 0\%$) a 25°C durante dos días.

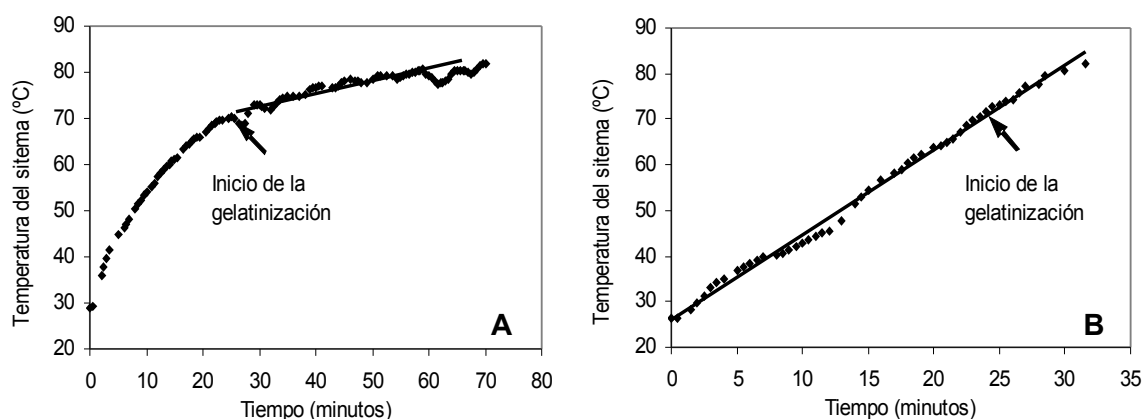


Figura 1.13 Temperatura del sistema a lo largo de la gelatinización. Panel A: Método 1. Panel B: Método 2 y 3.

Para todas las técnicas de gelatinización ensayadas, la temperatura final de las suspensiones fue de 82°C . Posteriormente, se aplicó vacío a fin de eliminar las burbujas de aire ocluidas en las mezclas, previo al vertido de los geles obtenidos sobre las placas de petri de vidrio.

Una vez constituidas, las películas fueron separadas de las placas de petri y suspendidas en soportes, de forma tal de evitar el contacto de unas contra otras (Figura 1.14).

Previamente a la evaluación de sus propiedades físico-químicas, las películas se estabilizaron en atmósfera de H.R. $57,6\%$ generada dentro de un desecador conteniendo en su base solución saturada de NaBr (Anedra, Argentina) durante 7 días a 25°C .



Figura 1.14 Disposición de las películas comestibles para su estabilización en atmósfera de H.R. 57,6%.

El espesor de las películas fue medido, con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) acoplado a un programa de adquisición de imágenes, en tres posiciones diferente de cada espécimen y con una precisión de 0,01 mm.

1.2.2 **Caracterización física y química de películas comestibles**

1.2.2.1 **Ensayos mecánicos**

Los ensayos para la caracterización de propiedades viscoelásticas de las películas estudiadas fueron llevados a cabo en un equipo analizador termo-mecánico dinámico, DMTA IV Rheometric Scientific (Rheometric Scientific Inc., New Jersey, USA).

Las muestras fueron evaluadas en modo Tensión Rectangular con una apertura inicial de 16 mm de longitud. Los especímenes fueron cortados apropiadamente con la ayuda de un molde de aluminio, especialmente diseñado para este propósito, y un escalpelo de acuerdo a Famá y col. (2005). La forma de las probetas fue elegida atendiendo a la recomendación de la norma ASTM D4092 (1996) y considerando la máxima elongación permitida por el equipo utilizado (Figura 1.15). El cuello de las películas tenía una longitud de 10 mm por 5 mm de ancho. En la parte superior e inferior del cuello, las probetas tenían la forma de un cuarto de círculo de 2,5 cm de radio. La geometría seleccionada tiende a distribuir las tensiones uniformemente y evitar la ruptura de la probeta en el área de contacto con las mordazas.

Entre los soportes de las mordazas se colocó un aditamento para restringir la deformación, a fin de mantener la muestra firmemente sujeta sin una excesiva deformación en dicha región.

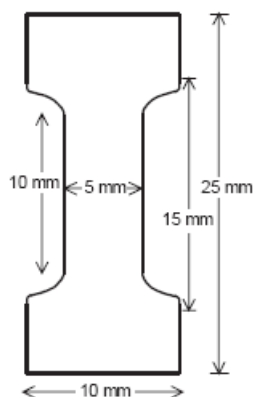


Figura 1.15 Geometría de las probetas para ensayos mecánicos (Famá y col., 2005)

Se realizó un examen microscópico de los especímenes a ser evaluados y las muestras defectuosas (presencia de burbujas de aire, rasgaduras o perforaciones) fueron descartadas.

1.2.2.1.1 Ensayos cuasi-estáticos

La velocidad de deformación fue fijada en un valor de $5 \cdot 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ y el ensayo fue llevado a cabo hasta ruptura, registrándose las curvas tensión (σ) - deformación (ϵ). Fueron evaluadas la tensión máxima (σ_b) y la elongación a ruptura (ϵ_b) de las películas. Los ensayos se realizaron por septuplicado para cada condición.

1.2.2.1.2 Ensayos dinámicos

Las muestras fueron estudiadas en el modo tensión y fueron sometidas a una deformación cíclica de 0,04%. Este valor de deformación era lo suficientemente pequeño como para asegurar que la respuesta mecánica de la muestra estuviera dentro del rango viscoelástico lineal, de acuerdo a comprobaciones realizadas previamente. Los ensayos oscilatorios fueron realizados a 1 Hz. Los datos fueron colectados bajo la rutina “dynamic temperature ramp test” a 25°C. Doce muestras fueron estudiadas para cada condición y tipo de película.

2.2.3.2 Cristalinidad de las películas comestibles

1.2.2.2.1 Difracción por Rayos X

Se utilizó un difractómetro Philips X-ray con goniómetro vertical (radiación Cu $K\alpha$, $\lambda=1,542 \text{ \AA}$). Las determinaciones fueron realizadas a 40 kV y 30 mA. Las películas fueron montadas sobre un portamuestras de vidrio y colocadas en el contenedor del

equipo. La intensidad de los rayos X fue registrada con un contador de centelleo en un rango de ángulo de dispersión (2θ) de $6-33^\circ$ utilizando una velocidad de barrido de $1^\circ/\text{min}$. La distancia entre los planos de los cristales d (Å) fueron calculados a partir del ángulo de difracción ($^\circ$) obtenido en el patrón de rayos X, de acuerdo a la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

donde λ es la longitud de onda del haz de rayos X y n es el orden de la reflexión. Para realizar los cálculos, éste último se tomó con valor 1.

A partir del espectro obtenido, el porcentaje de cristalinidad efectivo de las películas fue determinado, de acuerdo a Hermans y Weidinger (1961), como la relación entre la intensidad cristalina integrada y la intensidad total. El área cristalina fue evaluada en base al área de los picos principales (espaciamientos d más importantes). Debido a la complejidad de esta metodología, las cristalinidades calculadas no deben ser tomadas como absolutas, pero pueden ser utilizadas para propósitos comparativos.

1.2.2.3 **Contenido de humedad de películas comestibles**

El contenido de humedad en alimentos es una de las propiedades más comúnmente medidas. Es importante por distintas razones:

**Requerimientos legales y de etiquetado:* existen límites legales al contenido máximo y mínimo de agua en ciertos tipos de alimentos.

**Económicos:* el costo de muchos alimentos depende de la cantidad de agua que contienen. El agua es un ingrediente que incrementa el peso global del producto. El contenido de humedad tiene incidencia directa en los costos de empaquetamiento y transporte.

**Estabilidad microbiológica:* la tendencia de los microorganismos a crecer en alimentos depende de su contenido de agua. Por esta razón, muchos alimentos se secan por debajo de cierta humedad crítica.

**Calidad de los alimentos:* la textura, gusto, apariencia y estabilidad de los alimentos depende de la cantidad de agua que ellos contienen.

**Operaciones de procesamiento de alimentos:* habitualmente, el conocimiento del contenido de humedad, es necesario para predecir el comportamiento de los alimentos durante el procesamiento, por ejemplo durante el mezclado, secado, flujo a través de una cañería o envasado.

- **Metodología**

Las muestras fueron cortadas en forma de cuadrados de 0,5 cm de lado, aproximadamente, con la ayuda de una cuchilla metálica. Una vez cortadas, se colocaron en la base de frascos de vidrio de 30 mL de capacidad y se sometieron a secado en estufa de vacío a 70°C, hasta constancia de peso, lo cual demandó alrededor de 30 días. Para el seguimiento del cambio de peso se utilizó una balanza analítica Mettler AE240. Las determinaciones fueron realizadas por quintuplicado y se informa el promedio.

La humedad de las películas se determinó como:

$$\text{contenido de humedad (\%)} = \frac{(\text{masa húmeda} - \text{masa seca})}{\text{masa seca}} \times 100$$

1.2.2.4 Solubilidad en agua

La solubilidad es definida (Gontard y col., 1992) como el porcentaje de masa seca de la película, solubilizada luego de 24 horas de inmersión en agua destilada. El porcentaje inicial de materia seca fue determinado por secado de discos de 2 cm de diámetro en una estufa de vacío a 100°C, durante 24 horas. Paralelamente, otros discos fueron cortados, pesados y sumergidos en 50 mL de agua destilada, durante 24 horas a 25°C. Las películas remanentes fueron retiradas del agua y secadas (100°C en estufa de vacío, durante 24 horas) a fin de determinar la masa seca. La solubilidad es reportada como la relación entre la diferencia entre la masa seca inicial y la final (luego del tratamiento) con respecto a la masa seca inicial, expresada en porcentaje.

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{(\text{masa seca inicial} - \text{masa seca final})}{\text{masa seca inicial}} \times 100$$

1.2.2.5 Propiedades sorcionales y de barrera

1.2.2.5.1 Isotermas de sorción de vapor de agua

Las películas fueron cortadas en cuadrados de, aproximadamente, 0,5 cm de lado y colocadas en frascos de vidrio de 30 mL de forma tal de cubrir totalmente la base de dichos frascos, formando una capa sin superposiciones. El peso de las muestras fue de aproximadamente 0,3 - 0,4 g.

Para la determinación de la isoterma de sorción de agua, se utilizó el método estático (Mathlouthi, 2001) a 25°C. En primer lugar, las muestras se sometieron a secado sobre CaCl₂ en desecador al vacío. Una vez alcanzada la constancia de peso, las películas fueron introducidas por triplicado dentro de respectivos desecadores cuya H.R. fue fijada mediante el empleo de soluciones salinas saturadas. Las soluciones empleadas se detallan en Tabla 1.9.

La evolución de la humedad de las películas, fue seguida por pesada y se asumió el estado de equilibrio cuando las ganancia o pérdida de peso fue menor que 0,005 g / g de masa seca para tres pesadas consecutivas, a intervalos de tiempo mayores que cinco días (Biquet y Labuza, 1988). Luego de alcanzado el equilibrio de sorción, se determinó la humedad de las muestras según se describió anteriormente (ítem 1.2.2.3).

Tabla 1.9 Actividad de agua de las soluciones salinas saturadas utilizadas para la determinación de la isoterma de sorción de agua (Greenspan, 1977).

Solución salina saturada	a _w (25°C)
LiCl	0,113
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,328
K ₂ CO ₃	0,431
BrNa	0,576
ClNa	0,753
KCl	0,843
BaCl ₂	0,901
K ₂ SO ₄	0,973

1.2.2.5.2 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinada gravimétricamente, a 25°C, adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000).

Se construyeron celdas de permeabilidad en acrílico de las siguientes dimensiones: 4,4 cm de diámetro interno, 8,4 cm de diámetro externo, resultando un área expuesta de 15,205 cm²; la profundidad de las celdas fue de 3,5 cm. Cabe señalar que para llevar a cabo este ensayo, se fabricaron películas en placas de petri de 9 cm de diámetro.

Se colocó CaCl₂ en granallas (Anedra, malla 20) para disminuir la H.R. hasta, aproximadamente, 0% (presión parcial de vapor de agua \cong 0 Pa) y se ajustaron las

películas entre el tope de la celda y la tapa con la ayuda de cuatro tornillos. Para asegurar un correcto cierre, se aplicó grasa de vacío sobre planchas de goma adheridas a la tapa y el tope de la celda. La cámara de aire entre el desecante y la película fue de, alrededor, de 7 mm.

La celda fue ubicada en una cámara de humedad y temperatura controlada (Ibertest, España) ajustada a 25°C y 70% de H.R. (presión parcial de vapor de agua \cong 2288 Pa). Luego de, aproximadamente, 20-24 horas, la fase estacionaria de velocidad de transmisión de vapor de agua fue alcanzada y, a partir de ese momento, se registraron los incrementos de peso de la celda (precisión 0,5 mg) diariamente durante un período de 6 días. En esta fase, se obtiene una relación lineal entre el cambio de peso de las celdas y el tiempo de muestreo. Todos los ensayos fueron realizados, al menos, por triplicado

- **Cálculo de la permeabilidad al vapor de agua**

De acuerdo a la norma ASTM citada, a partir de los datos colectados del cambio de peso de las celdas en el tiempo, se calcula la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) según:

$$VTVA = \frac{G}{t \times A}$$

donde G / t es la pendiente de la recta obtenida (cambio de peso en gramos / tiempo transcurrido en horas) y A es el área de película expuesta (área de la celda), en m^2 .

A continuación, se calcula la Permeanza (P') de la película como:

$$P' = \frac{VTVA}{\Delta p}$$

siendo Δp la diferencia de presión de vapor de agua entre el interior de la celda y el exterior (cámara de humedad controlada).

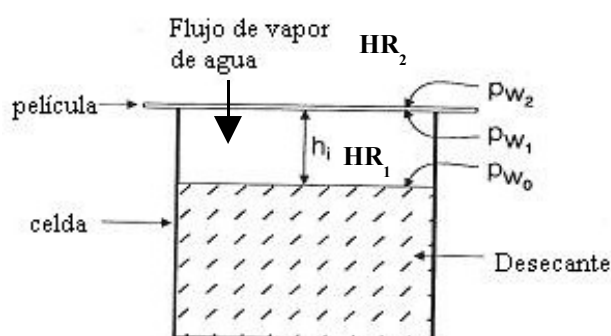
Finalmente, la permeabilidad se calcula multiplicando el valor de permeanza por el espesor de la película (e):

$$PVA = P' \times e$$

El método propuesto por ASTM hasta aquí descripto, considera que la resistencia a la transferencia de vapor de agua en el espacio de aire entre la película y el desecante es despreciable. Pero, cuando especímenes de alta velocidad de transmisión

de vapor de agua, como las películas comestibles hidrofílicas, son medidos con este método, la resistencia de la capa de aire estanco puede ser significativa. No tener en cuenta este hecho, puede conducir a subestimaciones importantes de la real VTVA. Gennadios y col. (1994) propusieron un *método de corrección de PVA*, que tiene en cuenta este fenómeno.

Según el método mencionado, la resistencia del espacio de aire a la transmisión de vapor de agua, puede ser considerada aplicando un análisis de difusión a través de una capa de gas estanco. El esquema siguiente indica las localizaciones de los valores de presión de vapor de agua y la altura del espacio de aire usados en el análisis.



donde p_{w0} es la presión parcial de vapor de agua adyacente a la superficie del desecante dentro de la celda (Pa)

p_{w1} es la presión parcial de vapor de agua adyacente a la superficie inferior de la película (Pa)

p_{w2} es la presión parcial de vapor de agua adyacente a la superficie superior de la película (Pa)

h_i es el espacio de aire entre la película y la superficie del desecante dentro de la celda (cm)

Cuando se usa el método del desecante, $p_{w1} < p_{w2}$, entonces, $HR_1 < HR_2$

HR_1 es la humedad relativa sobre el desecante dentro de la celda(%) y HR_2 es la humedad relativa fuera de la celda (%).

Por lo tanto $p_{w0} < p_{w1} < p_{w2}$; $p_{w0} = p \cdot HR_1 / 100$ y $p_{w2} = p \cdot HR_2 / 100$.

Luego,

$$\Delta p_a = p_{w2} - p_{w0}$$

$$\Delta p_r = p_{w2} - p_{w1}$$

$$p_{w1} = p_T - (p_T - p_{w0}) \exp(-N_w h_i / c D)$$

$$VTVA_c = VTVA_m [(p_{w2} - p_{w0}) / (p_{w2} - p_{w1})]$$

donde Δp_a es la diferencia de presión parcial de vapor de agua aparente a través de la película (Pa) y Δp_r es la diferencia de presión parcial de vapor de agua real a través de

la película (Pa); p_T es la presión atmosférica total (Pa); N_w es el valor medido de VTVA (g mol / cm² s); c es la concentración molar total de aire y vapor de agua (g mol / cm³), la cual puede ser estimada a partir de la ley de los gases ideales: $c = p_T / RT$ (R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta durante la experiencia); D es la difusividad del vapor de agua en el aire (cm² / s), la cual es usualmente estimada (a 1 atm) por la siguiente ecuación empírica: $D = 0,26 (T / 298)^{1,8}$; VTVA_c es el valor corregido de VTVA (g / m² día); VTVA_m es el valor medido de VTVA (g / m² día).

La permeabilidad corregida (PVA_c) al vapor de agua se puede calcular, entonces como:

$$PVA_c = (1,157 \cdot 10^{-5}) VTVA_c e / \Delta p_a$$

O bien como:

$$PVA_c = (1,157 \cdot 10^{-5}) VTVA_m e / \Delta p_r$$

siendo e expresado en m. El coeficiente $1,157 \cdot 10^{-5}$ satisface las conversiones de unidades, resultando PVA expresada en g/m s Pa.

1.2.2.5.3 Permeabilidad a los gases

La permeabilidad a los gases está definida de manera similar que en el caso de PVA. En este caso, se determinó la permeabilidad al oxígeno (P_{ox}) según norma ASTM 3985-02 (2002), la cual es una de las más comúnmente utilizadas para la evaluación de las propiedades de barrera de películas delgadas. Está basada en la determinación coulombimétrica de la velocidad de transmisión del oxígeno, siendo la alta sensibilidad de esta técnica (0,05 cm³ / m² día) una de sus mayores ventajas (McHugh y Krochta, 1994).

El equipo utilizado fue un Ox-Tran MS 2/61 (Mocon, MN). Previo a la realización del ensayo, las películas fueron acondicionadas durante 48 horas a 0% de H.R. y temperatura ambiente. Las condiciones operativas fueron las siguientes: acondicionamiento de 4 horas a 23°C y 0% H.R., concentraciones de oxígeno en el gas carrier a un lado y a otro lado de la película de 0 y de 21%, temperatura de trabajo 23°C, flujo de gas nitrógeno 10 cm³ / seg, flujo de gas oxígeno 20 cm³ / seg, área de medición 50 cm². El valor de velocidad de transmisión de O₂ (VTO₂) informado, corresponde a una diferencia de concentración de O₂ de 100% y una presión barométrica (compensada) de 760 mmHg. Las determinaciones fueron hechas por duplicado.

- **Cálculo de la permeabilidad al O₂ (PO₂)**

Los valores de VTO_2 obtenidos del equipo (cm^3 / m^2 día) fueron convertidos a unidades del sistema SI (mol / m^2s) multiplicando cada valor por el factor de conversión $5,16 \times 10^{-10}$. Luego la PO_2 fue calculada según:

$$PO_2 = \frac{VTO_2}{\Delta pO_2} \times e$$

donde ΔpO_2 es la diferencia de presión parcial de O_2 a través de la película (Pa) y e es el espesor de la película (m).

1.2.3 **Determinación de sorbato de potasio**

El contenido de sorbato de potasio de las películas soporte del preservativo fue determinado a través de la técnica oxidativa recomendada por la AOAC (1990), la cual involucra destilación por arrastre con vapor del ácido sórbico y reacción colorimétrica empleando ácido tiobarbitúrico, tal como se describe a continuación. Se reporta el promedio de cuatro determinaciones.

1.2.4 **Determinación de ácido sórbico**

La determinación cuantitativa del ácido sórbico requiere, en la mayoría de los casos, la extracción previa del preservador contenido en el alimento. Esto es debido a la baja concentración del mismo y a la posible presencia de sustancias que interfieren en su dosaje.

Se han aplicado diferentes técnicas para la extracción de ácido sórbico en alimentos, entre ellas se encuentran la destilación por arrastre con vapor, extracción con solventes, filtración, extracción por métodos combinados.

Con relación a los métodos analíticos que se aplican, la mayor parte de los mismos son inespecíficos y, por lo tanto, pueden estar afectados por los componentes del alimento y por los productos formados durante el almacenamiento de los mismos.

Entre ellos pueden mencionarse las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, cromatográficas y microbiológicas.

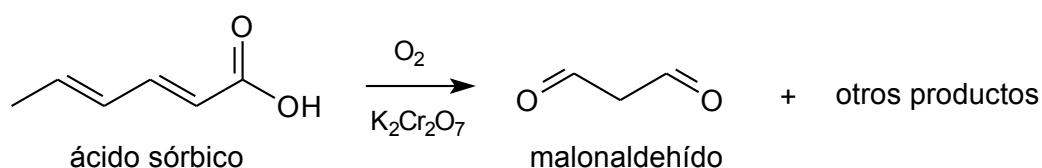
1.2.4.2 **Técnica empleada para la determinación de ácido sórbico**

El método de oxidación oficial propuesto por la AOAC (1990), comprende dos etapas:

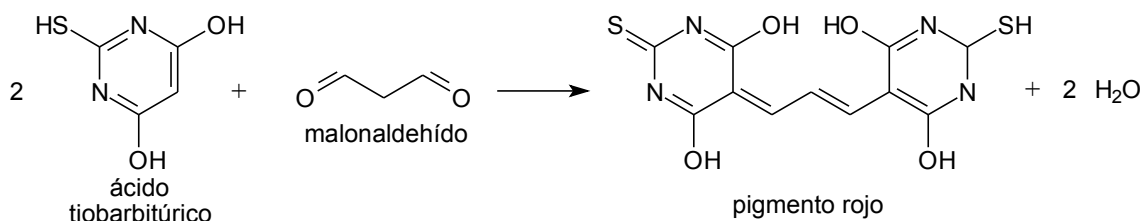
Primera etapa: consiste en la extracción del preservador mediante una destilación por arrastre con vapor, previa acidificación de la muestra a fin de desplazar el equilibrio del sorbato hacia la forma ácida, la cual es volátil y arrastrable con vapor.

El arrastre con vapor es una técnica de uso sencillo, que no genera desechos contaminantes, ya que no requiere el empleo de solventes.

Segunda etapa: consiste en la oxidación del preservador a malonaldehído por adición de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido:



Luego, se hace reaccionar el malonaldehído con ácido tiobarbitúrico formándose un pigmento rojo que se cuantifica colorimétricamente a 532 nm:



Campos y col. (1991) establecieron la precisión de esta técnica mediante la determinación del coeficiente de variación, siendo el mismo, 3,4%.

La reacción colorimétrica involucrada en esta etapa es muy sensible y permite cuantificar bajos niveles de ácido sórbico, los cuales están en el orden de 0,5 mg/L en el destilado (Lueck, 1976).

1.2.4.3 Metodología de la técnica de cuantificación empleada

a. Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. Los mismos fueron:

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Anedra).
- H_2SO_4 (98% p/p, Anedra): soluciones 2 N y 0,3 N.
- $K_2Cr_2O_7$ (Merck): se disuelven 1,470 g en agua destilada y se lleva a volumen final de 1000 mL.

- NaOH (97% p/p, Merck): solución 0,5 N.
- HCl (37% p/p, Mallinckrodt): solución 0,1 N.
- Sorbato de potasio (Sigma): solución estándar que se obtiene disolviendo 134 mg de sorbato de potasio en 1000 mL de agua destilada. En heladera, al abrigo de la luz, se conserva varios días.
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma): solución 0,500% que se obtiene disolviendo 250 mg de ácido tiobarbitúrico en 5,0 mL de solución de NaOH en un matraz de 50 mL. Se coloca el mismo en agua caliente y se agita hasta completa disolución del ácido; luego, se agregan 20 mL de agua destilada y se neutraliza con 3 mL de solución 0,1 N de HCl. Finalmente, se lleva a volumen final con agua destilada. La solución debe prepararse diariamente.

b. Primera etapa: Extracción del ácido sórbico

El equipo de extracción por arrastre con vapor utilizado se esquematiza en la Figura 1.16.

Se colocan en el portamuestra una cantidad apropiada de película y se adiciona al mismo 10 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 10 mL de solución 2 N de H_2SO_4 . El portamuestra se coloca en el equipo de extracción (Figura 1.16) y se realiza la destilación por arrastre con vapor recogiéndose 200 mL de destilado, el cual se diluye con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL. Luego, se reserva una alícuota para la cuantificación posterior.

Siguiendo las indicaciones mencionadas por la AOAC deben tenerse precauciones durante la operación de destilación, las cuales son, evitar que el volumen del líquido supere el 50% del volumen total del portamuestra y, evitar que la muestra se carbonice. Estos factores se controlan mediante la regulación de la entrada de gas del mechero ubicado bajo el portamuestra.

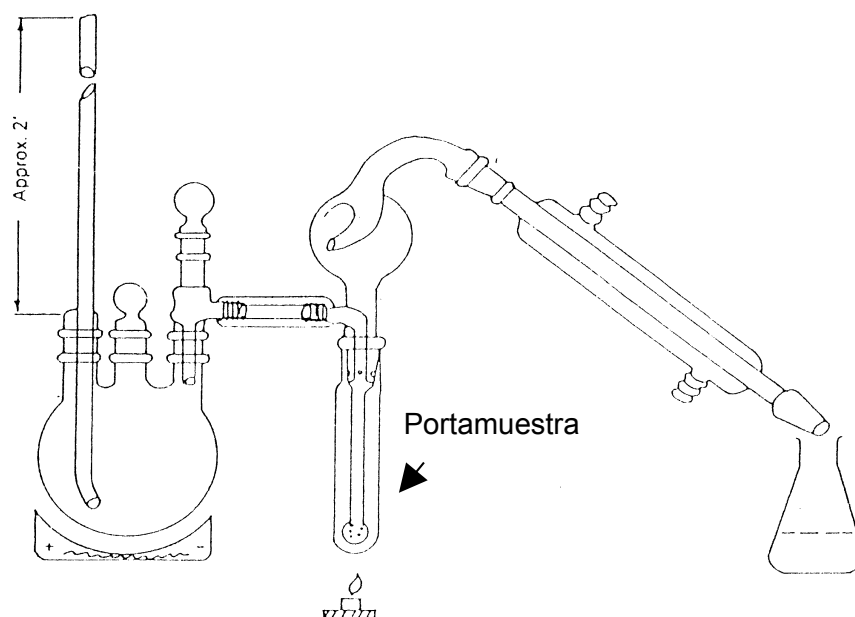


Figura 1.16 Esquema del equipo de destilación utilizado para la extracción del ácido sórbico mediante destilación por arrastre con vapor (AOAC, 1990).

c. Segunda etapa: Oxidación y cuantificación espectrofotométrica

Se coloca en un tubo de ensayos una alícuota de 2,0 mL de destilado y se le adicionan 1,0 mL de solución 0,3 N de H_2SO_4 y 1,0 mL de solución de $K_2Cr_2O_7$. Se calienta durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición. Luego, se enfría inmediatamente en un baño de hielo y se le adiciona 2,0 mL de solución de ácido tiobarbitúrico. Se vuelve a calentar en el baño de agua por un período de 10 minutos, al cabo del cual se enfría y se mide la absorbancia del complejo rojo formado, a 532 nm, en un espectrofotómetro (Spectro SC, LaboMed, USA) contra un blanco de reactivos.

d. Curva de calibración

Se realiza una curva de calibración con patrones, los cuales se preparan tomando 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0 mL de la solución estándar, respectivamente, y se los lleva a volumen final de 100 mL con agua destilada. Se miden alícuotas de 2,0 mL de cada solución patrón y se colocan en tubos de ensayos. Luego, se procede según se indicó en el párrafo anterior.

Una curva de calibración típica obtenida, es la siguiente:

Concentración de ácido sórbico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 532 nm
0,1	0,021
0,25	0,050
0,5	0,105
1	0,205
2	0,417
3	0,632

En todas las curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,999.

En el caso de destilados con un nivel de preservador superior a la máxima concentración considerada en la curva de calibración, se emplea la misma metodología descrita, pero utilizando una dilución apropiada del destilado.

1.2.4.4 Atributos de color

- **Metodología**

Discos de película de diámetro apropiado fueron apoyados sobre un plato blanco patrón (Trezza y Krochta, 2000) y se eliminaron eventuales burbujas de aire presionando levemente el espécimen, desde el centro hacia la periferia, con la ayuda de un papel celofán el cual fue luego retirado. Las mediciones de color fueron realizadas directamente sobre las películas con un colorímetro marca Minolta, modelo CM-508d (Tokyo, Japón) calibrado con un blanco patrón. El diámetro de apertura fue de 1,5 cm. Para cada muestra, se midieron los parámetros de Hunter (L , a y b), seleccionando el iluminante D-65 y observador a 2° , y el índice de amarillo (YI, yellow index), este último de acuerdo a la norma ASTM D1925 (1988). Las determinaciones de color fueron hechas en al menos cinco posiciones sobre la superficie de las películas: centro y cuatro puntos alrededor del mismo.

1.2.4.5 Análisis estadístico de los datos

Se realizó un experimento a dos factores (concentración de sorbato; técnica de gelatinización/secado) con mediciones repetidas sobre un factor (contenido de

sorbato). Se ensayaron dos niveles de sorbato (0 y 3000 ppm) y tres modos de procesamiento (Método 1, Método 2, Método 3). Se analizaron los datos a través de un ANOVA de dos factores con un nivel de significación (α) de 0,05. Se aplicó un test a posteriori (test de Tukey) a fin de establecer diferencias significativas. Los resultados son informados en base a su promedio e intervalo de confianza para un α : 0,05 (Sokal y Rohlf, 2000).

El utilitario Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, 1997 (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A) fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Propiedades de flujo y deformación de películas comestibles

1.3.1.1 Ensayos cuasi-estáticos

En la Figura 1.17 paneles A y B, se muestran las curvas tensión (σ) - deformación (ϵ) de las películas obtenidas con diferentes métodos de elaboración, con y sin el agregado de sorbato de potasio (KS) respectivamente. Puede observarse que la naturaleza de la deformación de los polímeros a temperatura ambiente, bajo la carga aplicada, fue típica de plásticos dúctiles.

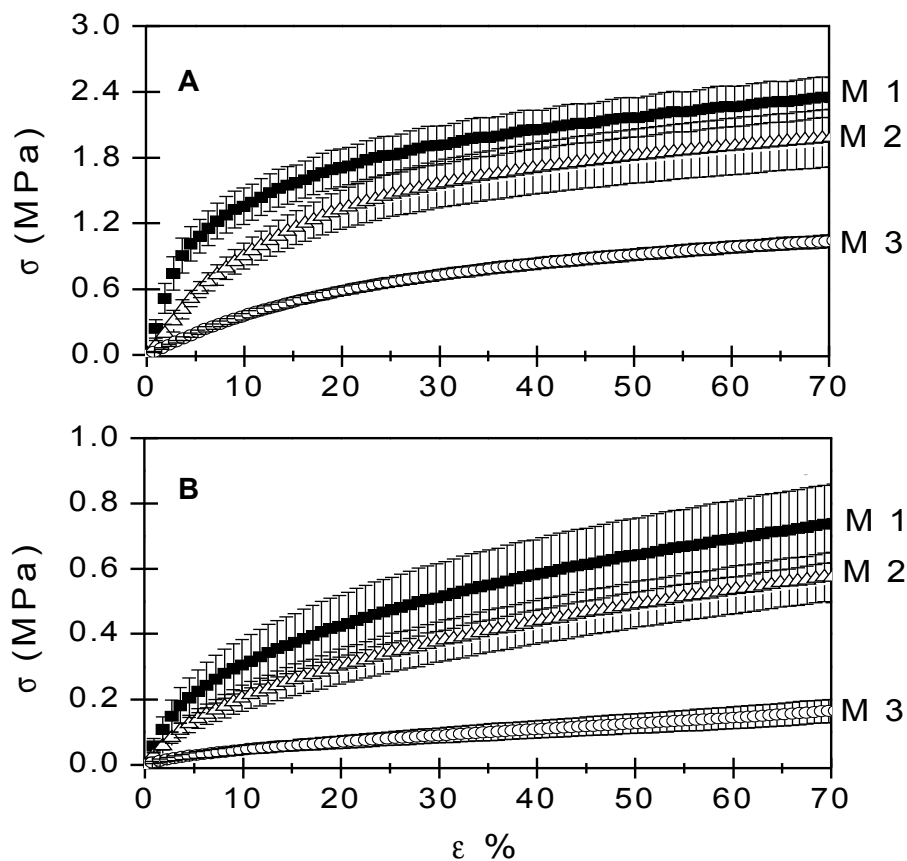


Figura 1.17 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre la relación tensión (σ)-deformación (ϵ) para películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca. Panel A: películas sin sorbato. Panel B: películas con sorbato. (■ método 1 (M1); \triangle método 2 (M2); \square método 3 (M3)).

Como generalmente ocurre para estos materiales, las películas exhibieron en sus curvas, dos regiones características de deformación. A bajas deformaciones (menores

que 10%), la tensión incrementó rápidamente con un aumento en la deformación y las pendientes iniciales fueron empinadas en la región elástica, indicando el alto módulo elástico de estos materiales. A altas deformaciones (mayores que 10%) las películas mostraron un lento incremento de la tensión con la deformación.

Es importante remarcar que la pendiente inicial de estas curvas, la cual define el módulo de Young, es dependiente de la temperatura y de la velocidad de deformación (Mano y Viana, 2001). Al evaluar los distintos tipos de fabricación, se observó que las películas obtenidas con el método 1 y el método 2 presentaron una tensión, a igual deformación, que fue significativamente mayor que la observada para el método 3, para ambas formulaciones ensayadas (con y sin sorbato).

Arvanitoyannis y col. (1998b), evaluaron métodos de secado a baja y alta temperatura con películas elaboradas con almidón de papa hidroxipropilado y gelatina utilizando polioles como plastificantes, y sugirieron que, a alta temperatura de secado, las cadenas poliméricas quedaron configuradas en un estado desordenado descrito por una baja cristalinidad y menor fuerza tensora a igual deformación.

Por otro lado, Biliaderis (1994) postuló que la separación de amilosa de la amilopectina durante prolongados tiempos de calentamiento es más eficiente, hecho que podría promover la gelación de la fracción lineal del almidón cuando el gel es enfriado. La salida de la amilosa del gránulo inicia el proceso de gelatinización, seguido por un incremento de las asociaciones de cadenas bajo la conformación de dobles hélices y posteriores interacciones de estos agregados, para formar una red. Consecuentemente, la rigidez del sistema aumenta. La densidad y tiempo de vida de las zonas de interacción entre la matriz continua de amilosa y la amilopectina, también influyen en las propiedades mecánicas de las películas.

Como puede ser observado en la Figura 1.17, el método 1 dio lugar a películas con mayores valores de tensión tanto en películas con o sin antimicrobiano. Todas las consideraciones previamente mencionadas, podrían haber contribuido en la obtención de una película más elástica cuando este método fue empleado, y en consecuencia, en la obtención de un mayor valor de la tensión. Es importante destacar que las películas estudiadas no mostraron un máximo discernible (ruptura) hasta una deformación del 80%, que corresponde a la máxima deformación posible en el equipo para la geometría de muestra usada.

La Tabla 1.10 muestra los valores de tensión (σ_b) obtenidos para la máxima deformación alcanzada de las películas con sorbato y sin sorbato, mostrando claramente que la fuerza tensora es siempre mayor para las muestras libres de antimicrobiano y que este comportamiento fue independiente del método de fabricación.

1.3.1.2 Ensayos dinámicos

Ya que las películas comestibles son sistemas que representan geles físicos formados por ordenamiento molecular y subsiguiente agregación/cristalización de cadenas poliméricas, es muy ventajoso el uso de ensayos a pequeñas deformaciones para revelar cómo cambios en la composición, estructura polimérica e historia tiempo-temperatura afectan los cambios estructurales e interacciones del almidón macromolecular.

Tabla 1.10 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre las propiedades mecánicas y cristalinidad de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca

	E' (MPa)	E'' (MPa)	σ_b (MPa) ($\epsilon = 70\%$)	Fracción cristalina
Método 1				
Sin sorbato	29,0 ± 9,0	7,2 ± 1,3	2,35 ± 0,18	30,0
Con sorbato	7,6 ± 0,7	3,1 ± 0,4 ^b	0,74 ± 0,12 ^{c, d}	9,4
Método 2				
Sin sorbato	13 ± 4	3 ± 1 ^b	1,98 ± 0,26	26,4
Con sorbato	4,3 ± 0,5 ^a	1,7 ± 0,2 ^b	0,57 ± 0,08 ^d	8,4
Método 3				
Sin sorbato	3,2 ± 1,1 ^a	0,9 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,1 ^c	15,5
Con sorbato	1,3 ± 0,5 ^a	1,0 ± 0,3 ^b	0,16 ± 0,04	6,4

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

En la Tabla 1.10 puede observarse que las películas obtenidas con el método 1 mostraron el más alto valor de E' mientras que con el método 3, se obtuvo el valor más bajo: tiempos largos de gelatinización y secado (método 1) resultaron en una red más elástica como consecuencia de un incremento del orden molecular y/o interacciones desarrolladas durante la retrogradación, como se explicó anteriormente.

El menor nivel de organización de las cadenas poliméricas alcanzado empleando el método 3, explicaría el aumento significativo (α : 0.05) de los valores de $\tan \delta$ para las películas conteniendo el antimicrobiano y obtenidas a través de este método ($0,78 \pm 0,03$ vs. $0,410 \pm 0,007$ - $0,40 \pm 0,01$; método 3 vs. métodos 1 y 2). La velocidad de secado involucrada en el método 3 es más rápida y esto provocaría la formación de una red más viscosa.

Puede observarse también en la Tabla 1.10 que los valores de E' de las películas sin sorbato son siempre mayores que aquellos de las películas con sorbato, para todas las técnicas de elaboración ensayadas, dejando en evidencia el efecto plastificante del

antimicrobiano. Dicho efecto fue previamente observado por Famá y col. (2005), quienes reportaron una disminución de la elasticidad de las películas elaboradas con almidón de mandioca, glicerol y sorbato, hecho que fue atribuido a la modificación estructural de la red de almidón cuando los sorbatos fueron incorporados, lo cual determinó que bajo la aplicación de un estrés, los movimientos de las cadenas poliméricas se vieran facilitados. Para las películas sin el agregado de sorbato, no fueron observadas diferencias significativas en los valores de $\tan \delta$ para los diferentes métodos aplicados ($0,254 \pm 0,004$, $0,244 \pm 0,005$ y $0,280 \pm 0,030$ para los métodos 1, 2 y 3).

1.3.2 *Cristalinidad de películas comestibles*

1.3.2.1 *Difracción de rayos x*

La Figura 1.18 muestra los patrones de difracción de rayos X de las películas sin y con sorbato para todos los métodos ensayados. Para cada muestra, los picos más intensos fueron identificados y las distancias (d) entre los planos de los cristales (Å) fueron calculados a partir del ángulo de difracción.

La fracción cristalina puede ser observada en la Tabla 1.10. Las películas con sorbato mostraron un patrón tipo B - V y una cristalinidad de 9,4, 8,4 y 6,4% para los métodos 1, 2 y 3 respectivamente, y pudieron ser observados espaciamientos d de, aproximadamente, 3,6, 4,5, 5,2 y 5,9 Å.

La presencia de agua en la fracción cristalina está limitada a la cantidad incorporada en la estructura del cristal; mientras que la fracción amorfa presenta la posibilidad de sorber una cantidad relativamente alta de agua (Zobel, 1994). Como puede ser observado en la Tabla 1.11 y, como consecuencia de una menor cristalinidad, las muestras obtenidas por el método 3 mostraron un contenido de humedad significativamente mayor (α : 0,05) luego de dos semanas de la gelatinización.

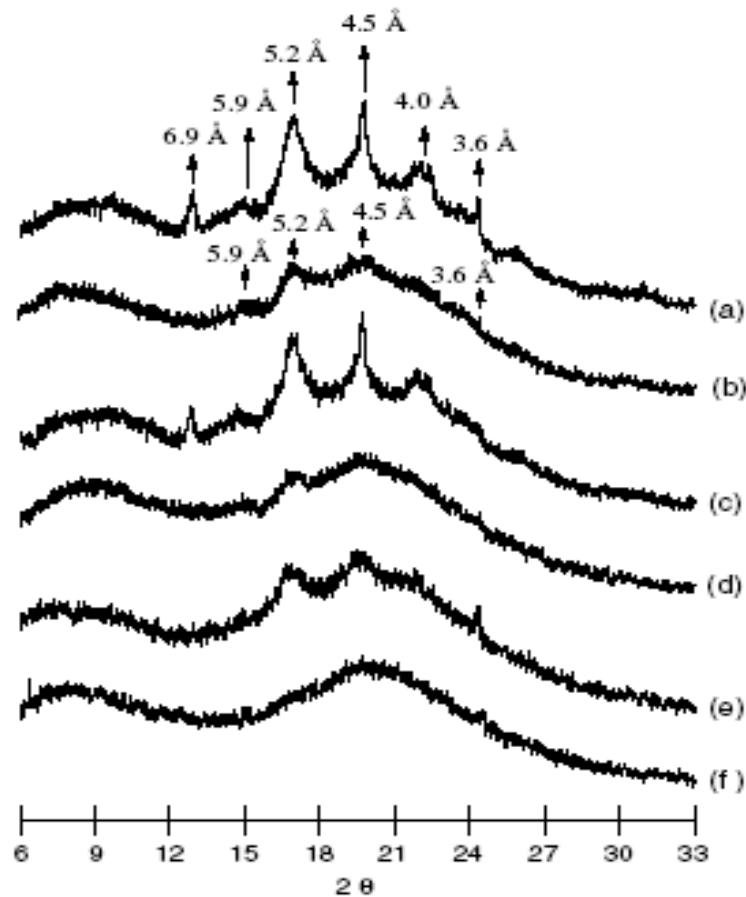


Figura 1.18 Patrón de difracción de rayos X de las películas estudiadas (a): M1 sin sorbato, (b): M1 con sorbato, (c): M2 sin sorbato, (d): M2 con sorbato, (e): M3 sin sorbato; (f): M3 con sorbato.

Es bien conocido el hecho de que el agua actúa como plastificante y, en consecuencia, esto afectaría el comportamiento mecánico de las películas de almidón. Este efecto plastificante podría también contribuir a la menor rigidez observada para las muestras obtenidas a través del método 3: valores menores de E' y σ_b .

Por otro lado, la lenta velocidad de secado pudo haber dado condiciones más propicias para promover el ordenamiento de las cadenas, determinando un nivel de cristalinidad similar para el método 1 y 2, y por lo tanto, cambios no significativos en el contenido de humedad.

Arvanitoyannis y col. (1998b) informaron que películas comestibles obtenidas por evaporación de soluciones de almidón hidroxipropilado - gelatina a 20°C durante una semana, dieron lugar a películas con cadenas poliméricas más densamente empaquetadas e incrementado orden molecular, como pudo concluirse por el mayor porcentaje de cristalinidad y mayor esfuerzo observado para las películas obtenidas por secado a baja temperatura. Las bajas y altas velocidades de gelatinización, junto con

una lenta velocidad de secado, utilizadas en el método 1 y método 2, probablemente determinaron una incrementada fracción cristalina, menor contenido de humedad y mayores valores de tensión y E'. El método 3 presentó un aumento de la fase amorfa debido a una rápida evaporación de agua.

Tabla 1.11 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre el contenido de sorbato, humedad y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca.

	Contenido de sorbato (g/100 g, b.s.)*	humedad (g/100 g, b.s.)*
<u>Método 1</u>		
Sin sorbato	---	42,7 ± 1,6 ^b
Con sorbato	4,00 ± 0,28 ^a	43,6 ± 1,3 ^b
<u>Método 2</u>		
Sin sorbato	---	41,3 ± 3,6 ^b
Con sorbato	4,51 ± 0,89 ^a	41,7 ± 0,8 ^b
<u>Método 3</u>		
Sin sorbato	---	49,0 ± 1,4 ^c
Con sorbato	5,98 ± 0,71	49,5 ± 3,6 ^c

* b.s.: base seca.

Se informan promedios e intervalos de confianza.

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

Las películas sin sorbato mostraron una mayor cristalinidad, 30,0, 26,4 y 15,5% para el método 1, 2 y 3 respectivamente. También fue observada una estructura cristalina tipo B - V (Fanta y col., 1999; Manzocco y col., 2003), probablemente debido a la presencia del plastificante (glicerol), y se observaron los siguientes espaciamentos d : 3,6, 4,0, 4,5, 5,2, 5,9, 6,9 (método 1 y 2) ó 4,0, 4,5, 5,2, 6,9 (método 3).

El mayor grado de cristalinidad para las películas sin sorbato explica su más alta tensión a ruptura así como los mayores valores de E' y los menores valores de $\tan \delta$. Probablemente, el sorbato ejerce un efecto plastificante el cual parcialmente previene el desarrollo de cristalización debido a que aquél puede interactuar con las cadenas poliméricas, obstaculizando su alineamiento y/o debido a que podría interferir con el empaquetamiento de la amilosa (Famá y col., 2005).

Un hecho particular fue observado: para los diferentes métodos de fabricación ensayados, el contenido de humedad de las películas de almidón de mandioca no cambiaba significativamente (α : 0,05) ya sea en ausencia o presencia de sorbato a pesar de que el grado de cristalinidad disminuía cuando el antimicrobiano estaba presente (Tabla 1.11).

Che y Rhee (2002) informaron un leve incremento en la humedad a diferentes H.R. de películas elaboradas con proteínas de soja cuando éstas eran plastificadas usando 0,3, 0,5 y 0,7 g de plastificante / g de proteína. Por otro lado, Rindlav y col. (1997) reportaron que el contenido de agua en películas basadas en almidón de papa, se incrementaba cuando se acrecentaba la cristalinidad tipo B, lo cual era parcialmente explicado por el mayor contenido de moléculas de agua de las áreas cristalinas de conformación B comparadas con el contenido de agua de las zonas amorfas.

Godbillot y col. (2005) observaron que por debajo de una H.R. del 44%, películas elaboradas con almidón de trigo y glicerol fueron menos higroscópicas que las no plastificadas. Esto nos demostraría la capacidad de algunas sustancias como el glicerol, de bloquear el ingreso de agua al sistema por la interacción que él mismo establece con el almidón.

Probablemente el contenido de humedad observado en el presente trabajo son una evidencia de la interferencia del sorbato en el empaquetamiento de la amilosa debido al desarrollo de enlaces tipo puente de hidrógeno polímero-sorbato, los cuales reemplazan a las interacciones polímero-polímero (Yang y Paulson, 2000) y del efecto inhibitorio del antimicrobiano en cuanto a la formación de enlaces de hidrógeno polímero-agua en las áreas amorfas. Según lo publicado por Jeffrey (1996), el enlace de hidrógeno entre el sorbato y el almidón sería del tipo fuerte, ya que se encuentra involucrado en dicho enlace, un grupo aceptor de protones cargado negativamente (carboxilato).

Es también posible que el agua incorporada en la estructura cristalina tipo B, presente en una alta proporción en las películas sin sorbato, compense el potencial decrecimiento de agua sorbida por disminuir la fracción de sistema con estructura amorfa.

1.3.3 Contenido de sorbato

La Tabla 1.11 muestra la concentración de sorbato de potasio de las películas dos semanas después de la gelatinización. A pesar de que las formulaciones de partida para cada método de fabricación analizado contenían igual concentración de KS, el

método 3 mostró el mayor contenido de sorbato, hecho que puede ser atribuido a los más cortos procesos de gelatinización y secado involucrados. Gerschenson y Campos (1995) mostraron que el calentamiento excesivo resulta en un incremento de la destrucción del sorbato.

1.3.4 Solubilidad

Como se aprecia en la Figura 1.19, la solubilidad de las películas fue esencialmente la misma (aproximadamente 22%), para todas las técnicas de obtención aplicadas, pero se incrementó significativamente cuando el sorbato de potasio estaba presente en la formulación.

Este hecho implica que la presencia del antimicrobiano produjo estructuras menos organizadas, como se mostró en los difractogramas de rayos X, y más proclives a la disolución en agua.

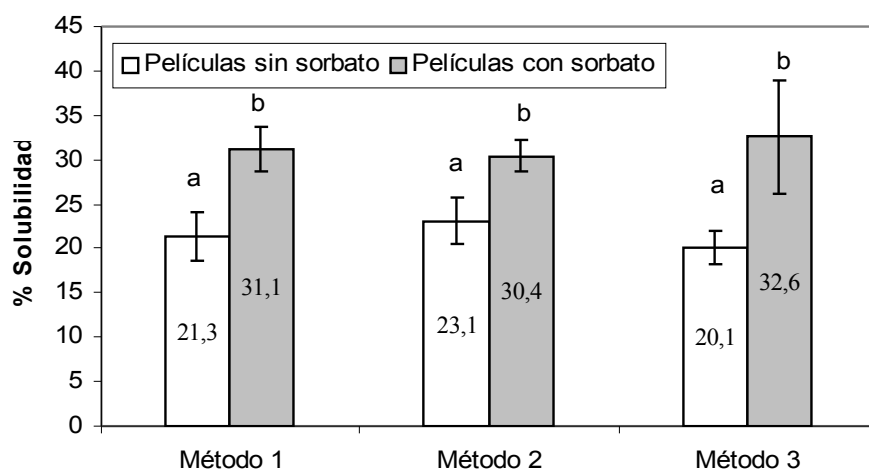


Figura 1.19 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre la solubilidad de las películas (se informan promedios e intervalos de confianza). Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

Las películas con sorbato mostraron, por ende, mayor interacción con el solvente, resultando solubilidades de, aproximadamente, 31% para todos los métodos de gelatinización / secado ensayados.

Este último resultado es de interés ya que un incremento en la solubilidad puede conllevar a problemas de integridad de la película en algunas situaciones tecnológicas.

1.3.5 Propiedades sorcionales y de barrera

1.3.5.1 Isoterma de sorción de vapor de agua

En la Figura 1.20 se aprecian las isotermas de sorción de las películas conteniendo KS para los tres métodos de elaboración estudiados.

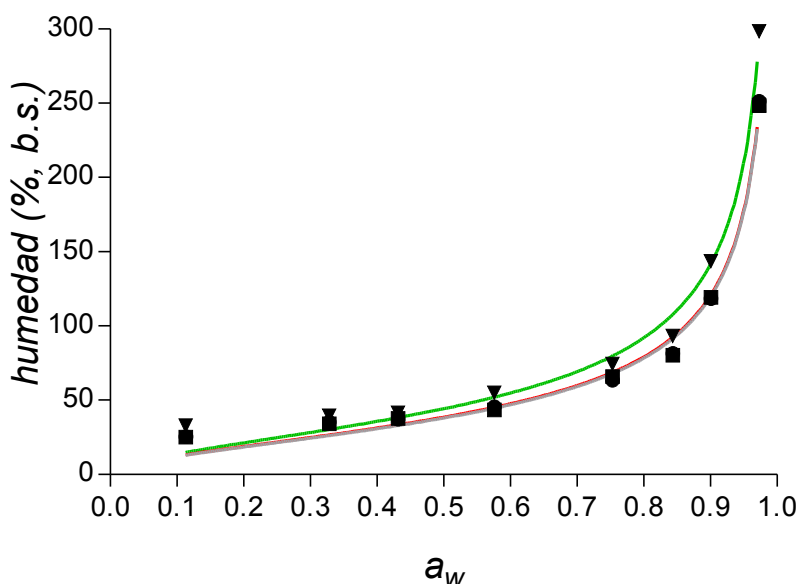


Figura 1.20 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre la isoterma de sorción, a 25°C, de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca y conteniendo KS. ■ método 1; ● método 2; ▼ método 3. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos con la ecuación de Oswin: — método 1; — método 2; — método 3.

Las curvas obtenidas revelan un leve incremento en la humedad con el aumento del a_w hasta, aproximadamente, valores de 60% de H.R. (a_w : 0,60). Luego, la humedad de las películas aumenta rápidamente para a_w entre 0,75 y 0,97. Si bien la forma de la curva es similar para todas las fabricaciones ensayadas, el método 3 presentó humedades mayores que los métodos 1 y 2 para todas las a_w estudiadas. Este comportamiento se debería al mayor carácter amorfo de las películas obtenidas con una velocidad de secado acelerada, tal como fue revelado en el estudio de cristalinidad realizado con la técnica de difracción por rayos X.

Los datos sorcionales pudieron ajustarse con la ecuación de Oswin y en la Tabla 1.12 se resumen los parámetros obtenidos.

De acuerdo al análisis de los parámetros, las películas obtenidas a través de gelatinización rápida o lenta pero con secado a baja velocidad, presentan características sorcionales similares. Para el método 3, el parámetro a resultó significativamente diferente que los obtenidos para los métodos 1 y 2. Sin embargo el

parámetro n , no presentó diferencias significativas para los tres métodos de fabricación estudiados.

Tabla 1.12 Parámetros de ajuste de los datos sorcionales a 25°C, de películas comestibles conteniendo KS.

Método de elaboración	Parámetros de Oswin		
	a (% b.s.)	n	R^2
M1	$38,0 \pm 1,6^a$	$0,521 \pm 0,014^b$	0,9889
M2	$38,6 \pm 1,7^a$	$0,518 \pm 0,015^b$	0,9870
M3	$44,3 \pm 2,3$	$0,528 \pm 0,017^b$	0,9826

Se informan los mejores valores obtenidos del ajuste y sus errores estándar. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (α : 0,05).

R^2 : bondad del ajuste.

Con el objeto de comparar el comportamiento sorcional de películas portadoras de KS con aquellas libres de preservador, se determinaron las isotermas de sorción de películas elaboradas a través del método 2 pero sin el agregado de sorbato de potasio. Los parámetros obtenidos del ajuste de los datos a la ecuación de Oswin fueron los siguientes: $(37,3 \pm 1,8)\%$, b.s. (a) y $0,528 \pm 0,015$ (n), los cuales no difieren significativamente de los parámetros obtenidos para la película con sorbato. Este resultado refuerza lo postulado anteriormente, en cuanto a la interferencia del sorbato en la formación de enlaces puente de hidrógeno polímero-agua en las áreas amorfas de las películas, en todo el rango de a_w estudiado. Se puede entonces concluir que el comportamiento sorcional de las películas no se ve afectado por la presencia del antimicrobiano.

1.3.5.2 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Los valores corregidos de PVA pueden ser observados en la Figura 1.21. El método 3 dio origen a películas con un valor significativamente mayor de PVA como consecuencia de una red almidonácea menos compacta. Es importante destacar que esta técnica de gelatinización y secado prácticamente duplicó el valor de PVA cuando se compara con el método 1. La presencia de sorbato no afectó la permeabilidad al vapor de agua. Resultados similares fueron reportados por Cagri y col. (2001), para películas con base proteica conteniendo 0,50 y 0,75% de ácido sórbico. Es un hecho conocido que las películas comestibles tienden a ser pobres barreras contra la humedad debido a la abundancia de grupos hidrofílicos en la matriz biopolimérica (Kester y Fennema, 1986).

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que la técnica aplicada para preparar las películas puede ayudar a mejorar las propiedades de barrera. En nuestro caso, el método 1 dio origen a películas con el valor más bajo de PVA.

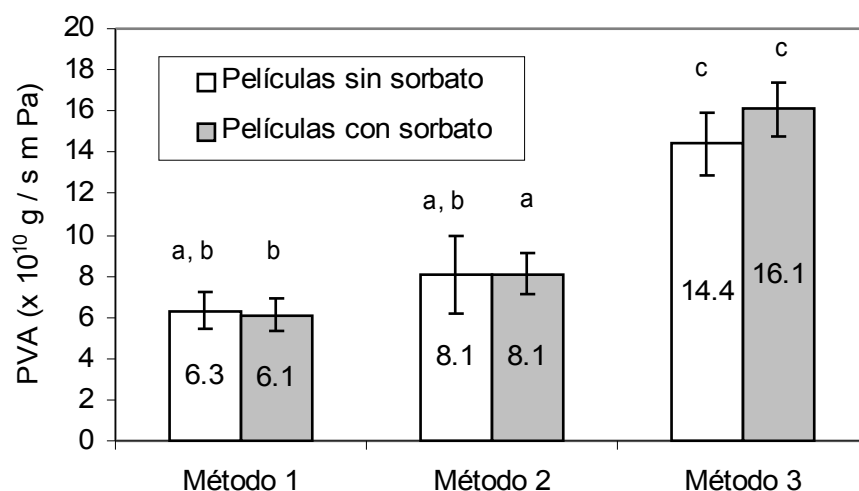


Figura 1.21 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre la permeabilidad de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca (se informan promedios e intervalos de confianza). Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

1.3.5.3 Permeabilidad al oxígeno (PO_2)

Los valores de permeabilidad al oxígeno, para las películas conteniendo sorbato de potasio se pueden observar en la Tabla 1.13.

Estos valores concuerdan con los reportados por otros autores: $6,76 \times 10^{-18}$ mol / m s Pa (coberturas a base de almidón de maíz, 24°C, McHugh y Krochta, 1994); 3,6 a $7,2 \times 10^{-18}$ mol / m s Pa (películas de amilosa y amilopectina de papa, 23°C y 50% H.R., Rindlav-Westling y col., 1998).

Tabla 1.13 Influencia del método de fabricación en la permeabilidad al oxígeno de películas comestibles conteniendo sorbato de potasio

Método de elaboración	$PO_2 \times 10^{18}$ (mol / m s Pa)
M1	$10,8 \pm 1,3$
M2	$5,89 \pm 0,75$
M3	$1,22 \pm 0,21$

Espesores de las películas estuvieron entre 0,3 y 0,4 mm.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los métodos 1 y 2 presentaron valores significativamente (α : 0,05) mayores de PO_2 , que el método 3. Como se indicó anteriormente, las películas obtenidas con el método 1 presentan una mayor fracción

cristalina mientras que las elaboradas con el método 3 resultaron más amorfas. La teoría de polímeros indica que, en general, a mayor fracción cristalina la permeabilidad a los gases simples disminuye (Stannett, 1968), ya que las zonas cristalinas están empaquetadas en forma extremadamente compacta y ello disminuye la difusividad de los gases. De acuerdo con Polyakova y col. (2001), la formación de cristales, excluye componentes no comprometidos en la red hacia la fase amorfa; ello determina que la fase amorfa vea alterada su estructura y, por ende se vea también afectada la solubilidad de los volátiles. Probablemente en nuestro caso, estos cambios de solubilidad en la fase amorfa prevalecerían a los cambios en la difusividad del oxígeno. Por otro lado, es de destacar que Rindlav-Westling y col. (1998) reportaron que las permeabilidades al oxígeno de películas elaboradas con amilosa o amilopectina no fueron afectadas por los cambios en la cristalinidad de dichas películas, y sugirieron que la permeabilidad podría estar afectada en mayor medida por la microestructura de las películas que por el grado de cristalinidad.

A fin de establecer la influencia de la presencia del antimicrobiano en la PO_2 , se determinó el valor de permeabilidad para películas obtenidas través del método 2 y sin sorbato de potasio. Recordemos que el antimicrobiano ejerce un efecto plastificante en las películas estudiadas. El valor obtenido fue de $(8,4 \pm 1,3) \times 10^{-18}$ mol / m s Pa, el cual es levemente superior a la correspondiente PO_2 de las películas conteniendo el preservador. Nuevamente se observa un efecto opuesto al descrito para polímeros sintéticos, donde la menor adición de plastificantes conlleva a una disminución en la permeabilidad. Sin embargo, algunos materiales como el acetato de celulosa, ven disminuida su permeabilidad al CO_2 cuando aumenta la cantidad de plastificante hasta un determinado nivel a partir del cual la permeabilidad aumenta con el contenido de plastificante (Stannett, 1968).

Se destaca que, independientemente del método de elaboración, las películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca - glicerol y conteniendo o no sorbato de potasio, son excelentes barreras al oxígeno (particularmente a bajas H.R. ambiente), en comparación con películas plásticas de uso corriente, como por ejemplo polietileno de baja y alta densidad (1529×10^{-18} y 306×10^{-18} mol / m s Pa, respectivamente) y poliestireno (637×10^{-18} mol / m s Pa) (Park, 2003).

1.3.6 Atributos de color

La Tabla 1.14 muestra los parámetros de color para las películas estudiadas.

Tabla 1.14 Efecto de la técnica de gelatinización / secado sobre los parámetro de color de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca

	a ^j	b ^j	L ^j	YI ^k
Método 1				
Sin sorbato	-1,08 ± 0,02 ^a	5,02 ± 0,01 ^b	85,42 ± 0,04 ^d	10,10 ± 0,03 ^g
Con sorbato	-0,57 ± 0,07	5,95 ± 0,07 ^c	82,40 ± 0,30 ^{e, f}	13,02 ± 0,26 ^h
Método 2				
Sin sorbato	-1,14 ± 0,03 ^a	5,11 ± 0,14 ^b	84,45 ± 0,43 ^{d, e}	10,36 ± 0,38 ^g
Con sorbato	-0,82 ± 0,03	5,64 ± 0,17 ^c	82,20 ± 1,80 ^f	12,02 ± 0,46 ^{h, i}
Método 3				
Sin sorbato	-1,17 ± 0,02 ^a	4,75 ± 0,11 ^b	85,63 ± 0,13 ^d	9,44 ± 0,26 ^g
Con sorbato	-0,69 ± 0,04	5,56 ± 0,08 ^c	83,24 ± 0,33 ^{d, f}	11,87 ± 0,20 ⁱ

Se informan promedios e intervalos de confianza. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

^j: parámetros de la escala Hunter

^kYI: índice de amarillo.

Como puede observarse, el método de fabricación de las películas afectó el valor de dichos parámetros. Puede apreciarse que el parámetro “a” fue negativo para todas las películas estudiadas y que su módulo fue, significativamente más pequeño, cuando el sorbato estaba presente. Las películas conteniendo el antimicrobiano y obtenidas a través del método 1, mostraron el valor más bajo del módulo de “a”.

Con referencia a la luminosidad “L” y al parámetro “b”, el método de fabricación no produjo diferencias significativas para las películas conteniendo sorbato. En general, la presencia de sorbato produjo una disminución en “L”, un incremento en “b” y en el Índice de amarillo (YI), mostrando que las películas conteniendo el antimicrobiano se pardearon más intensamente.

También puede observarse en la Tabla 1.14 que las películas conteniendo el antimicrobiano y obtenidas por el método 1 mostraron el valor más alto de YI, mientras que las películas fabricadas por el método 3 presentaron el valor más bajo. Como fue mencionado anteriormente, este último método pareciera prevenir más eficientemente la degradación del sorbato y, por lo tanto el desarrollo de color pardo.

1.3.7 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente capítulo se puede concluir que, en general, las técnicas de gelatinización y secado empleadas para la elaboración de películas comestibles, modifican las propiedades físico-químicas de las mismas, siendo destacable que:

- ✓ Tiempos prolongados de gelatinización y bajas velocidades de secado (método 1) resultaron en una red más elástica, con mayor grado de cristalinidad y menor PVA.
- ✓ Cuando los sistemas estudiados fueron gelatinizados con una más rápida velocidad de calentamiento y fueron secados lentamente (método 2), las películas obtenidas mostraron menor carácter elástico e incrementaron levemente la PVA.
- ✓ La rápida evaporación del agua durante el secado (método 3) asociada a una más rápida gelatinización, dio origen a una matriz menos organizada y, consecuentemente, más amorfa. Esta característica estructural, afectó sus propiedades sorcionales, aumentando el contenido de humedad, y empobreciendo sus propiedades de barrera al vapor de agua. No obstante, se observó una disminución en la permeabilidad al oxígeno en este tipo de películas.
- ✓ El método 3 pareciera prevenir más eficientemente la degradación del sorbato y desarrollo de pardeamiento y, por lo tanto, se destacan los beneficios de aplicar cortos tiempos para la gelatinización y el secado, en relación a la estabilidad del antimicrobiano y a la aceptabilidad por parte del consumidor.
- ✓ El método 3 dio origen a películas con pobres características mecánicas, hecho que podría afectar la funcionalidad de la película en sus aplicaciones.
- ✓ La solubilidad en agua de las películas no se vio afectada por la metodología de fabricación empleada, pero sí por la presencia de KS, el cual incremento la fracción soluble de la matriz de almidón.
- ✓ La permeabilidad al oxígeno de todas las películas estudiadas fue mucho menor que la mayoría de los plásticos de uso habitual, por lo que son altamente recomendadas para alimentos susceptibles a la oxidación.
- ✓ Se recomienda tener en cuenta las características del producto al cual la película comestible será aplicada y el propósito final de su uso, a fin de balancear las diferentes tendencias reportadas y determinar el método de obtención que resulte más conveniente.

Es de destacar la acción plastificante desarrollada por el KS, condicionando las propiedades mecánicas de las películas obtenidas por todos los métodos aplicados, así como el contenido de humedad de las mismas.

CAPÍTULO 2

LIBERACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SORBATO DE POTASIO SOPORTADO EN PELÍCULAS COMESTIBLES

INFLUENCIA DEL MÉTODO DE FABRICACIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Estabilidad microbiológica de los alimentos

Una de las formas en que los alimentos se alteran es debido a la acción de bacterias, levaduras y mohos que desarrollan en ellos. Estos microorganismos presentan, en conjunto, gran variedad de actividades metabólicas, y en consecuencia pueden deteriorar estos productos de muy distintas formas (Mossel y Moreno García, 1985).

Estos microorganismos pueden ser:

Saprófitos: causando determinadas alteraciones químicas que hacen que los productos sean inadecuados para el consumo humano

Patógenos: pueden dar origen a graves infecciones e intoxicaciones cuando se ingieren los alimentos contaminados.

Considerando la diversidad de sustancias que constituyen los alimentos o que se emplean en su formulación y procesamiento, se puede concluir que, prácticamente todas las clases de microorganismos, son posibles agentes contaminantes. Sin embargo, se producirá una selección microbiana según las propiedades físicas y químicas del alimento y las condiciones del medio ambiente.

En la práctica, los parámetros que influyen la selección de la microflora presente inicialmente en un alimento y que son la causa de la multiplicación de sólo una parte de ella, pueden clasificarse del siguiente modo:

- Factores intrínsecos: son la expresión de las propiedades físicas y de la composición química del alimento, así como algunas propiedades biológicas del mismo.
- Modificación de la microflora inicial introducida por tratamientos tecnológicos: son tratamientos físicos, principalmente térmicos, de efecto letal variable sobre los microorganismos o químicos con repercusión en la composición del alimento.
- Factores extrínsecos: son los propios del ambiente donde se conserva o almacena el alimento (temperatura, humedad y presión de oxígeno). Afectan tanto a los microorganismos como a los alimentos.
- Factores implícitos: son relaciones de dependencia entre microorganismos, antagonismos o sinergismos que se establecen en la selección inicial, resultante de la acción de los factores antes mencionados.

Estos factores determinan lo que se denomina resistencia a la colonización de un alimento. Los microorganismos que consigan prosperar serán resistentes a los factores selectivos que operen en un determinado alimento, en las condiciones usuales de transporte, almacenamiento y conservación (Doyle y col., 1997).

Desde el punto de vista del consumidor, cada vez es más importante tener una garantía total de la seguridad y la calidad de los alimentos, ya que esto le permitirá, en primer lugar, proteger la integridad de su salud y, en segundo término, evitar pérdidas económicas.

En el ámbito industrial, la comercialización de alimentos seguros es un requerimiento tanto a nivel legal, como de mercado.

Inhibir el crecimiento y/o conducir la muerte de la comunidad microbiológica del alimento, como así también prevenir el establecimiento de otras comunidades, es el principal objetivo de la aplicación de métodos de preservación.

2.1.2 ***Métodos de preservación de alimentos tradicionales y emergentes***

Desde tiempos remotos, se han realizado importantes esfuerzos en preservar a los alimentos del deterioro inducido por algunos microorganismos. Procesos tales como el calentamiento, secado, fermentación y refrigeración han sido usados para prolongar la vida segura de los alimentos. Algunos preservadores tales como sales, nitritos y sulfitos han estado en uso por muchos años, sin embargo otros, sólo recientemente tienen uso extensivo (Zeuthen y Bøgh-Sørensen, 2003).

Una de las razones para el incremento del uso de preservadores ha sido el cambio en las formas en que los alimentos son producidos y comercializados. Actualmente los consumidores esperan alimentos que estén disponibles en todas las épocas del año, que estén libres de patógenos y que posean una vida segura razonablemente prolongada. Asimismo, el uso de sistemas de proceso y empaquetamiento seleccionados, han introducido algunas mejoras en la preservación (Davidson y col., 2002).

2.1.2.1 ***Métodos tradicionales de preservación***

- ***Tratamientos térmicos***

Un tratamiento térmico letal adecuado es central en la preservación de alimentos por aplicación de calor, ya sea para prevenir el riesgo a la salud pública como para lograr un producto de vida segura comercialmente viable.

Debido a su naturaleza, los procesos térmicos tienen un efecto negativo sobre algunos atributos de calidad (organolépticos y nutricionales) de los alimentos y, por lo tanto, deben estar diseñados para balancear los objetivos deseados de una esterilidad comercial con los requerimientos comerciales de un producto de alta calidad.

La preservación de alimentos por aplicación de calor es lograda por la inactivación a gran escala de microorganismos viables. Un proceso térmico es requerido para alcanzar esterilidad comercial, es decir lograr un alimento libre de microorganismos viables, incluyendo aquellos de conocida importancia para la salud pública, capaces de crecer en el alimento a las temperaturas de distribución y almacenamiento a las cuales el alimento es comúnmente mantenido. En general, *Clostridium botulinum* es considerado como el organismo patógeno más resistente al calor, y el de mayor capacidad para sobrevivir a procesos térmicos. Las esporas sobrevivientes de este microorganismo pueden germinar en el contenedor y producir toxinas, lo cual puede ser fatal para el consumidor.

La severidad de un tratamiento térmico seleccionado es una función de la probabilidad de supervivencia del microorganismo de interés. Distintas variables, incluyendo actividad de agua y pH del producto, influyen dicha probabilidad y deben ser tenidas en cuenta cuando se definen las condiciones de contorno de un proceso térmico (Bown, 2003).

▪ **Deshidratación**

La conservación de alimentos por deshidratación se basa en la reducción de la actividad de agua (a_w) para inhibir el desarrollo de microorganismos, así como otras formas de deterioro, ya que la a_w influye en el progreso de reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas. La deshidratación reduce también el peso y el volumen, lo que disminuye los gastos de transporte y almacenamiento.

El contenido y estado físico del agua en los alimentos influye en las características físicas, químicas, de calidad, seguridad y funcionales de los componentes de los alimentos (Kinsella y Fox, 1986).

En realidad, es el agua disponible para la actividad bioquímica, enzimática o microbiana, la que determina la vida útil de un producto y esto es lo que se conoce como "actividad de agua".

Este concepto (a_w) asume equilibrio termodinámico y establece que a_w es igual a f/f_0 donde f es la fugacidad del agua en el sistema (la tendencia del agua a escaparse de una solución) y f_0 es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura. Para un

gas ideal en una mezcla o para gases reales a baja presión, la relación de fugacidades puede ser reemplazada por la relación de presiones:

$$a_w = \frac{p_w}{p_w^0} = \frac{HR}{100}$$

donde p_w es la presión de vapor de agua en equilibrio con el alimento, p_w^0 es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. p_w puede ser medida o relacionada con la humedad relativa (H.R.) de la atmósfera en equilibrio con el alimento.

Como también a_w es igual al producto entre la fracción molar de agua y su coeficiente de actividad ($x_w \cdot \gamma_w$), puede inferirse que la a_w depende de la concentración de agua del alimento.

La medida de a_w generalmente correlaciona bien con el potencial para el crecimiento microbiano y actividad metabólica empleándose, por lo tanto, como un buen indicador de la disponibilidad del agua para el desarrollo de microorganismos. Como resultado, el a_w , más que el contenido total de humedad, determina el crecimiento, muerte, supervivencia, esporulación y producción de toxinas de diversos microorganismos en los alimentos.

El a_w óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos está en el rango de 0,99-0,98, y cada uno tiene una a_w límite por debajo de la cual no podrá desarrollarse, formar esporas o producir metabolitos tóxicos (Leistner, 1995).

La deshidratación disminuye la a_w a valores menores a 0,6, y altera, en cierto grado, tanto las características organolépticas como el valor nutritivo de los alimentos. Uno de los objetivos en el diseño y manejo de las instalaciones de deshidratación consiste en conseguir reducir al mínimo las modificaciones que los alimentos experimentan durante el proceso, utilizando para ello las condiciones adecuadas para cada alimento en particular (Fellows, 1994).

La deshidratación en corriente de aire es una operación simple y económica. Los principales problemas asociados con ella son el encogimiento causado por el colapso celular, las pobres características de rehidratación del producto seco y los cambios desfavorables en el color, textura, "flavor" y valor nutritivo (Achanta y Okos, 1995).

Diferentes autores han reportado cambios asociados a la deshidratación de alimentos tales como la modificación de la cristalinidad de la pared celular, desorganización de las microfibrillas de celulosa y ruptura de la laminilla media, pérdida de la funcionalidad del plasmalema debido al estrés osmótico con pérdida del

turgor, ruptura de membranas, gelatinización del almidón y fusión y redistribución de grasas (Achanta y Okos, 1995).

- **Congelación**

La temperatura es un factor ambiental que influye significativamente en la velocidad de crecimiento, la actividad metabólica, los requerimientos nutricionales, la composición química y la velocidad de captación de sustratos. A medida que la temperatura desciende por debajo del óptimo, el crecimiento se hace más lento y finalmente se detiene (Kennedy, 2003).

Los alimentos almacenados a temperaturas de refrigeración, se alteran con el tiempo por la multiplicación de microorganismos psicrótrofos (rango de crecimiento entre -5 y 40°C) y psicrófilos (rango de crecimiento entre -15 y 20°C).

A fin de no alterar su calidad, los alimentos congelados deben mantenerse a temperaturas por debajo de los -18°C. A estas temperaturas cesa toda multiplicación microbiana. Pero algunas enzimas siguen actuando hasta -30°C. por lo cual es importante escaldar los alimentos a ser congelados (Fellows, 1994).

- **Antimicrobianos**

Al seleccionar un agente antimicrobiano, varios factores deben ser tenidos en cuenta: el espectro antimicrobiano debe ser conocido, las propiedades físicas y químicas tanto del preservador como del alimento deben ser conocidas (pK_a y solubilidad del antimicrobiano, pH del alimento), las condiciones de almacenamiento del producto y las interacciones con otros ingredientes deben ser evaluadas para asegurar que el preservador mantenga funcionalidad en el tiempo, el alimento debe poseer la más alta calidad microbiológica inicial si se pretende que un antimicrobiano contribuya a su vida segura, pues ningún antimicrobiano es capaz de preservar un producto que esté groseramente contaminado. Asimismo, la seguridad toxicológica y los aspectos regulatorios del compuesto seleccionado deben ser considerados (Davidson, 1993).

El Código Alimentario Argentino (2006) define como conservadores a las sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas.

En la mayoría de los casos, el antimicrobiano tiende a extender la fase lag o a inactivar un número de microorganismos. Debido a que los preservadores antimicrobianos son generalmente bacteriostáticos o fungistáticos, no preservarán un alimento en forma indefinida sino que, dependiendo de las condiciones de

almacenamiento, los productos eventualmente se dañarán o se volverán peligrosos (Davidson y col., 2002).

Algunos antimicrobianos aprobados por distintas agencias reguladoras para actuar como aditivos directos en alimentos fueron mencionados anteriormente en la sección 1.1.1.3.

2.1.2.2 ***Métodos emergentes***

La demanda creciente de alimentos de alta calidad, mínimamente procesados, libres de aditivos artificiales y con mínimo deterioro térmico, ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación de los alimentos.

La Tabla 2.1 describe brevemente algunos de estos nuevos métodos:

Tabla 2.1 Métodos de preservación emergentes (Zeuthen y Bøgh-Sørensen, 2003)

MÉTODO	FACTOR	EFEECTO
Luz de alta intensidad	Radiación no ionizante (luz blanca, UV, IR cercano)	Desnaturalización de proteínas (enzimas y reparadoras del ADN). Ruptura y cortes en la estructura del ADN. Inactivación superficial de células microbiana e insectos.
Ultrasonido	Ondas de ultrasonido Cavitación acústica por microburbujas	Inactivación de enzimas causada por: altas temperaturas alcanzadas, radicales libres generados por sonólisis del agua y fuerzas mecánicas (cizalla) creadas por micro-corrientes y shock de ondas. Daño físico a paredes y membranas celulares.
Atmósferas modificadas	Diferentes concentraciones de O ₂ y CO ₂	Alteración del metabolismo por ausencia del O ₂ . Disolución del CO ₂ y reducción del pH del medio. Penetración celular, descenso del pH del citoplasma, acción específica sobre enzimas y/o membranas biológicas. Detención o enlentecimiento del crecimiento de microorganismos específicos
Pulsos eléctricos de alto voltaje	Alto potencial eléctrico	Formación de poros y permeabilización de la membrana celular. Incremento de la permeabilidad de las membranas, destrucción de las mismas y muerte celular.
Alta presión hidrostática	Alta presión	Afecta la morfología, reacciones bioquímicas, mecanismos genéticos, pared y membranas celulares (ruptura mecánica). Disociación de uniones iónicas intramoleculares de las proteínas. Permeabilización de las membranas celulares con pérdida total del material celular.
Filtración por membrana	Membrana sólida de separación física	Separación por tamaño de los componentes de un fluido, debido a una diferencia de presión a través de la membrana. Retención de los microorganismos en el retentado. Permeato estéril.
Pulsos de campos magnéticos oscilantes	Campos magnéticos oscilantes	Ruptura de uniones covalentes de macromoléculas (ADN) con dipolos magnéticos. Inhibición del crecimiento y reproducción.
Radurización, radicación y radapertización	Radiaciones ionizantes (rayos X, rayos γ)	Cambian la estructura de la membrana celular y afectan las actividades enzimáticas y metabólicas de los microorganismos.

2.1.2.3 Tecnología de factores combinados o de barreras

La base de esta tecnología está constituida por una combinación de factores de estrés microbiano que interaccionan aditivamente o sinérgicamente, controlando el desarrollo de microorganismos en los alimentos.

El fundamento de la combinación de factores o barreras es interferir con los mecanismos homeostáticos celulares de manera cooperativa, aplicando cada uno de estos factores en dosis leves; es decir, si se considera la aplicación de ellos en forma individual, no producirían ni la muerte ni la inhibición del crecimiento microbiano (Leistner, 1995).

Así, se evita la aplicación de un solo factor de conservación en forma intensiva con la consiguiente mejora en la calidad organoléptica y nutricional del alimento. También, permiten la formulación de productos mínimamente procesados o de alta humedad con características similares a las del producto fresco, con menos aditivos satisfaciendo las demandas actuales de los consumidores.

Los factores en combinación a usar pueden ser: descenso del pH, descenso de la a_w , tratamientos térmicos suaves, irradiación (Battey y col., 2002; Leistner, 1995). El uso de películas o coberturas comestibles como un factor de estrés microbiano en combinación con otros, está siendo ampliamente investigado y se ha determinado su aptitud en varios campos de aplicación (Krochta y col., 1994).

2.1.3 Películas comestibles como un factor en combinación

El uso de películas comestibles en la industria alimenticia es un tópico novedoso de gran interés debido a su potencial para incrementar la vida segura de los alimentos.

Como se mencionó en la introducción general, dentro de los posibles modos de acción que las películas o coberturas comestibles pueden ejercer para preservar un dado producto, se pueden mencionar los siguientes (Kester y Fennema, 1986):

- Retardar la migración de humedad
- Retardar el transporte de gases (O_2 , CO_2)
- Retardar la migración de aceites y grasas
- Retardar el transporte de solutos
- Mejorar las propiedades mecánicas frente al manipuleo e Impartir integridad estructural adicional a los alimentos
- Retener compuestos volátiles responsables del “flavor”
- Soportar aditivos alimentarios

Las películas comestibles pueden actuar de manera adicional o cooperativa con otros factores, en la mejora de la calidad global del alimento, proveyendo protección hacia la contaminación microbiana exterior, extendiendo la vida útil del alimento y, posiblemente, mejorando la eficiencia de los materiales de empaquetamiento.

Además de presentar ventajas como biodegradabilidad, posibilidad de ser ingeridos, baja permeabilidad al oxígeno (Han, 2000), estas películas son una vía importante para actuar como barrera o para la incorporación de aditivos alimentarios como antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes, colorantes, los cuales pueden mejorar su apariencia, textura, sabor o propiedades el almacenamiento (Cuppet, 1994).

En particular, los antimicrobianos pueden ser adicionados a las películas comestibles para retrasar el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias durante el almacenamiento y distribución, a través de la actuación de las películas como barrera a la contaminación o de reservorios para la liberación gradual del antimicrobiano. Algunos ejemplos de antimicrobianos son: ácido benzoico y su sal de sodio, ácido sórbico y su sal de potasio, ácido propiónico y nisina (Han, 2000; Buonocore y col., 2003.)

Considerando que el crecimiento microbiano superficial es la principal causa de deterioro para muchos productos alimenticios, es importante destacar que la calidad de los alimentos puede ser afectada por la habilidad de los preservadores a difundir desde la superficie hacia el interior del producto, si son aplicados directamente. De acuerdo con Guilbert (1988), las coberturas comestibles protectoras pueden ser usadas para asegurar la retención de los aditivos, controlar la concentración superficial del preservador y prevenir que difundan libremente en el alimento.

2.1.3.1 ***Películas comestibles y el concepto de “envase activo”***

Bureau (1996) ha destacado las ventajas de utilizar un material activo de empaquetamiento, el cual libere sustancias permitidas que contribuyan a la estabilidad del producto. Esto podría ser de particular interés en el caso de productos alimenticios almacenados a temperatura ambiente.

Las películas comestibles capaces de actuar como medio de provisión de sustancias activas, pueden incluirse dentro de los denominados “*envases activos*” que han sido definidos como “una clase de envoltorio que cambia la condición del embalaje para extender la vida útil, mejorar la seguridad o propiedades sensoriales mientras mantiene la calidad del alimento”. Esta definición fue propuesta por el proyecto europeo FAIR CT 98-4170 (Vermeiren y col., 1999).

Dentro de los distintos tipos de envases activos, las películas comestibles pueden clasificarse dentro de la categoría de “emisores”, la cual incluye a los materiales de empaquetamiento que contienen o producen sustancias (sustancias activas) capaces de migrar dentro del espacio cabeza del alimento o dentro del alimento mismo, con el objetivo de obtener un efecto tecnológico en la atmósfera, en el envase o en el alimento (Figura 2.1). Estas sustancias activas pueden ser, en principio, algún aditivo alimentario permitido. En este caso, el consumidor ingiere junto con el alimento dicha sustancia (Fabech, 2000; Han, 2000).

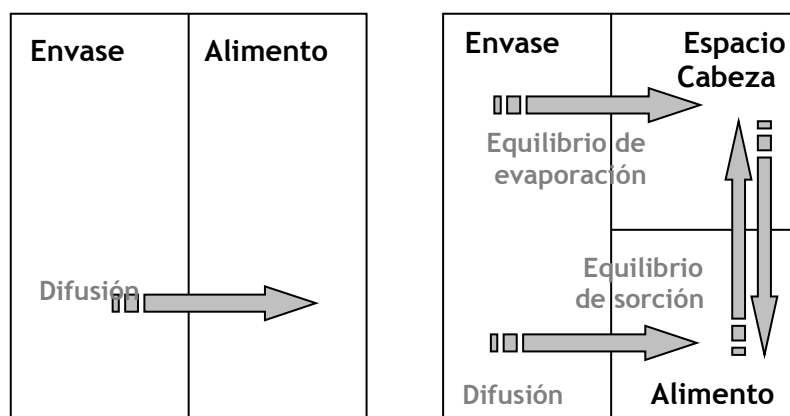


Figura 2.1 Envases activos emisores.

2.1.3.2 ***Evaluación de efectividad de antimicrobianos soportados en películas comestibles***

Una vez que se ha tomado la decisión de incorporar una sustancia activa a un material de empaquetamiento, surge la necesidad de contar con metodologías analíticas que permitan evaluar la efectividad de tales sustancias para cumplir con los objetivos para los cuales se la ha propuesto.

Numerosos estudios han sido realizados para determinar la eficacia (biodisponibilidad) de los antimicrobianos contenidos en películas comestibles, ya sea sobre medios sólidos o bien en medios líquidos. En los últimos años muchos investigadores han considerado el uso de películas comestibles como material soporte de antimicrobianos en productos alimenticios, o bien como herramienta para proveer lenta liberación de dicho antimicrobiano. Se pueden mencionar estudios de: películas como soporte de natamicina y sorbato de potasio con fines de aplicación superficial de antimicrobianos (Franssen y col., 2002), películas para proveer lenta liberación de lisozima y nisina (Buonocore y col., 2003 a y b), películas como material adicionado con

sorbato o benzoato (Chen y col., 1996), películas para la liberación prolongada de propilparabeno (Chung y col., 2001).

Como se mencionó anteriormente, conocer las propiedades de movilidad y la velocidad de liberación de las sustancias activas soportadas en películas comestibles, es de interés ya que estas propiedades influirán profundamente en la efectividad de la cobertura en cuanto a asegurar la calidad microbiológica del producto. Dependiendo del alimento de aplicación y de los objetivos perseguidos, puede ser deseable una rápida liberación del antimicrobiano para que actúe en el alimento o, por el contrario, una lenta velocidad de liberación para mantener una concentración crítica en la superficie que evite *in situ* la proliferación de microorganismos (Franssen y col., 2003).

A continuación, se describirán los antecedentes bibliográficos de ensayos realizados, para evaluar la eficacia de antimicrobianos soportados en películas comestibles y sus fundamentos, con especial referencia a su aplicación al estudio del KS como parte de un envase activo.

2.1.4 **Evaluación de la liberación de sustancias activas**

▪ **Métodos químicos**

Existen antecedentes en el ámbito farmacéutico (Capello y col., 2006, Desai, 2005, Siepmann y col., 1999, Dumoulin y col., 1998), de estudios de liberación de drogas a partir de comprimidos u otros soportes particulados, donde se determina la cantidad de fármaco liberado *in vitro* a un medio líquido que simula un fluido corporal (jugo gástrico o intestinal, por ejemplo). Algunos de estos ensayos están incluso normalizados en métodos oficiales (Farmacopea de cada país).

En el ámbito de la tecnología de alimentos, es también posible, dosar la concentración de antimicrobiano liberado a un medio receptor líquido o sólido, adecuando las metodologías analíticas existentes.

En estudios destinados a evaluar los mecanismos difusivos del sorbato de potasio desde películas de κ -carragenano (Choi y col., 2005) o de proteínas del suero láctico (Ozdemir y Floros, 2001) a medios líquidos, se cuantificó la cantidad de preservador liberado a través de la lectura espectrofotométrica directa a 253 nm. Con el mismo objetivo, Chung y col. (2001) estudiaron la liberación de propilparabeno desde un embalaje antimicrobiano hacia soluciones acuosas de reducida actividad de agua, evaluando el compuesto por cromatografía líquida (HPLC).

A su vez, Giannakopoulos y Guilbert (1986) estudiaron la difusión del ácido sórbico en modelos de alimentos elaborados con geles de agar-agar, y su vinculación con la concentración del agente gelificante, la temperatura y la concentración inicial de ácido sórbico en los geles. En este caso, la cantidad de antimicrobiano en los geles fue determinado por cromatografía gaseosa.

A partir de estos datos es posible calcular parámetros cinéticos que describan las características de movilidad del preservador.

▪ **Métodos microbiológicos**

En algunos casos no es posible cuantificar la forma activa del preservador por tratarse de sustancias cuya actividad no es adecuadamente apreciada en métodos químicos convencionales o por no contar con técnicas analíticas apropiadas.

En estos casos la cantidad de antimicrobiano liberado se mide indirectamente a través de un microorganismo indicador, el cual puede estar presente en el medio receptor, tal como se describirá en la sección 2.1.5.

Otra posible alternativa es, a modo de ejemplo, lo propuesto por Dawson y col., (2003) quienes determinaron la cantidad de nisina liberada a partir de una película proteica mediante la técnica de difusión en agar (halo de inhibición) usando el microorganismo *Lactobacillus plantarum*. Estos autores sumergieron muestras de película en agua destilada con agitación y retiraron alícuotas de líquido a distintos tiempos, las cuales fueron evaluadas con la técnica del halo, determinándose los diámetros de las zonas de inhibición. La concentración de nisina fue expresada como unidades internacionales por mL de agua por medio de una curva de calibración.

2.1.4.1 **Caracterización de la cinética de liberación de sustancias activas**

El propósito de la aplicación de una película conteniendo una sustancia activa a la superficie de un alimento puede ser conseguir una liberación controlada del agente antimicrobiano desde el soporte polimérico hacia el producto alimenticio, a fin de mantener una concentración predeterminada de la sustancia activa, en el alimento recubierto, durante un período determinado de tiempo (Han, 2000).

También puede interesar el controlar la velocidad de liberación para asegurar una cantidad suficiente de antimicrobiano en el alimento, a nivel superficial, de modo tal que se pueda inhibir la contaminación externa por microorganismos y, de este modo, prolongar la vida útil del alimento (Guilbert, 1988).

Entre los factores que influyen en la velocidad de liberación de una sustancia activa soportada en una matriz polimérica, se pueden mencionar:

- Factores que dependen de la sustancia activa: su solubilidad en el medio receptor y su coeficiente de partición entre la matriz soporte y el medio receptor (estructura química, carga iónica), su peso molecular.

- Factores que dependen de la matriz polimérica: su interacción y/o solubilidad en el medio receptor (naturaleza química, polimorfismos, fracción amorfa), su superficie libre (tamaño y porosidad).

- Factores que dependen del alimento o del medio receptor en el ensayo de liberación: polaridad, pH, fuerza iónica, viscosidad, presencia de solutos (tensoactivos).

Otros aspectos a considerar son: la carga inicial de la sustancia activa en la matriz soporte que condiciona la fuerza impulsora, la temperatura y las condiciones operativas del ensayo de liberación, por ejemplo si se hace con o sin agitación. Es importante que estas condiciones sean análogas a aquellas propias de situación real.

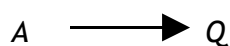
Para la interpretación de los resultados de los ensayos cinéticos, se debe tener presente que distintas condiciones experimentales empleadas en los ensayos pueden dar lugar a cinéticas diferentes (Cid Cárcamo, 1981).

En un ensayo cinético, la concentración de la/s especie/s presente/s en el medio cambia/n con el tiempo. La velocidad con la que ocurren dichos cambios es determinada midiendo el valor de alguna propiedad conveniente como una función del tiempo (Castellan, 1971).

Con el propósito de describir la cinética involucrada en un dado ensayo, se han establecido leyes empíricas que permiten cuantificar los cambios en las concentraciones de las especies.

- **Leyes de velocidad**

Si consideramos



la velocidad de este proceso puede ser expresada en términos del cambio de concentración de alguna de las sustancias involucradas en función del tiempo. Puede considerarse el decrecimiento de la concentración de A o bien el aumento de la concentración de Q en el tiempo:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{dQ}{dt}$$

Luego, es indistinto elegir una u otra derivada para expresar la velocidad. En general, la velocidad del cambio es una función de la concentración de todas las especies involucradas en el proceso:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{dQ}{dt} = f(A, Q)$$

Esta expresión es la *ley de la velocidad* para la reacción. En muchos casos, la ley de la velocidad tiene una forma simple:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{dQ}{dt} = k A^\alpha Q^\beta$$

donde k , α y β son constantes. La constante k es la constante de velocidad o velocidad específica, la constante α es el orden de la reacción con respecto a A y β es el orden con respecto a Q . El orden global es la suma de $\alpha + \beta$. El orden de la reacción gobierna la forma matemática de la ley de la velocidad y, por lo tanto, la variación de la concentración de todas las especies en el tiempo. La determinación del orden de la reacción con respecto a varias sustancias intervinientes, es uno de los primeros objetivos de un ensayo cinético.

A continuación se describirán dos situaciones habitualmente encontradas con referencia a la liberación de una sustancia activa desde un material soporte sólido a un medio receptor (Desai, 2005; Cid Cárcamo, 1981).

a) **Cinética de orden cero:** este orden se puede observar en los casos en que una pequeña cantidad de sustancia activa es liberada en un gran volumen de disolvente. En este caso, la influencia de la cantidad de sustancia activa que se va liberando es despreciable, determinando una cinética de pseudo orden cero.

Si A representa la cantidad total de sustancia incorporada inicialmente al soporte, Q la cantidad de esta sustancia que ha sido liberada y k_0 la constante de velocidad de liberación de orden cero, la variación de Q en función del tiempo queda definida por:

$$\frac{dQ}{dt} = k_0$$

cuya integración entre el tiempo cero y t , da:

$$Q_t = k_0 t$$

Conforme a esta expresión, la velocidad con que se libera la sustancia activa es constante con el tiempo e independiente de la concentración inicial en la película soporte.

b) **Cinética de primer orden:** en estos casos, a medida que la cantidad de sustancia activa es liberada, el medio receptor se va enriqueciendo en dicha sustancia. Se observa que la velocidad de liberación es función de la concentración de la sustancia en el soporte. La disminución de A en función del tiempo en el soporte, puede expresarse por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 A$$

siendo k_1 , la constante de liberación de primer orden.

La integración entre el tiempo cero y t , da:

$$A_t = A_0 e^{-k_1 t}$$

donde A_t es la cantidad de sustancia activa no liberada a tiempo t y A_0 es cantidad de sustancia activa presente inicialmente.

Considerando que la cantidad de sustancia activa agregada inicialmente es igual a la cantidad de la misma en el medio receptor, luego de un tiempo infinito ($A_0 = Q_{inf}$), se puede escribir:

$$A_t = Q_{inf} e^{-k_1 t}$$

Por otro lado, si la cantidad de sustancia activa que pasa al medio a tiempo t es Q_t , la cantidad que va quedando en el soporte al mismo tiempo es

$$A_t = Q_{inf} - Q_t$$

Luego, se puede obtener la siguiente expresión:

$$Q_{inf} - Q_t = Q_{inf} e^{-k_1 t}$$

y reordenando:

$$Q_t = Q_{inf} (1 - e^{-k_1 t})$$

2.1.4.2 **Caracterización del mecanismo de liberación de sustancias activas**

- **Transferencia de materia por difusión**

La transferencia de materia por difusión es el transporte de moléculas entra regiones en las cuales existe un gradiente de concentración. Debido a que existe una

diferencia de concentración del compuesto que difunde en dicha zona, hay una transferencia neta desde la zona más concentrada hacia la menos concentrada (Welti-Chanes, 2003).

La teoría matemática de la difusión en medios isotrópicos está basada en la siguiente hipótesis: la velocidad de transferencia de la sustancia que difunde a través de una sección de área unitaria, es proporcional al gradiente de concentración que existe normal a dicha sección (1º ley de Fick):

$$F = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

donde F es el flujo o la velocidad de transferencia por sección de área unitaria en la dirección x , C es la concentración de la sustancia que difunde, x es la coordenada espacial perpendicular a la sección y D es el coeficiente de difusión, el cual depende de la especie que difunde y de las condiciones del ensayo. En algunos casos, D puede asumirse constante, mientras que en otros, depende fuertemente de la concentración (Varzakas y col., 2005).

- ***Coefficiente de difusión constante y medio isotrópico***

Los casos donde ocurre transferencia de un compuesto, pero su concentración no cambia con el tiempo en cualquier posición del sistema (difusión en estado estacionario) pueden ser descritos utilizando la ecuación anterior.

Por el contrario, para los casos de difusión en estado no estacionario, donde la concentración local del compuesto que difunde cambia con el tiempo (existe acumulación), la 1º ley de Fick debe ser derivada teniendo en cuenta el balance de masa para un elemento de volumen por donde ocurre la difusión, y la velocidad de cambio de la cantidad de compuesto en dicho volumen. Para gradientes de concentración en una dirección, por ejemplo a lo largo del eje x , se obtiene:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

ecuación diferencial conocida como la 2º ley de Fick.

Las soluciones para esta ecuación pueden ser obtenidas por métodos analíticos, numéricos y gráficos. Soluciones analíticas para la difusión en una dimensión en una placa infinita, cilindro infinito y en una esfera han sido halladas asumiendo un valor constante de D y condiciones de contorno apropiadas (Crank, 1956).

Por lo general, la solución a la segunda ley de Fick tiene una de dos formas estándar. Puede aparecer en la forma de una serie trigonométrica que converge para valores grandes del tiempo, o puede contener una serie de funciones de error o integrales relacionadas que son más adecuadas para la evaluación numérica cuando los valores del tiempo son pequeños (Welty y col., 1999).

El arreglo experimental para la determinación del coeficiente de difusión de un dado soluto dependerá, en principio, del medio en donde éste difunda: a través de una fase gaseosa, líquida o sólida (Geankoplis, 1999).

La mayoría de los métodos empleados asume que el coeficiente de difusión es constante. Cuando tales métodos son aplicados a sistemas en los cuales ello no se cumple, se obtiene un valor promedio o "*D efectivo*" para las condiciones del experimento (Varzakas y col., 2005). El principal requisito para un ensayo de determinación de *D efectivo* es seleccionar y obtener una serie de concentraciones del soluto de interés en función del tiempo. Los métodos consideran la peculiaridad de la situación experimental a considerar. Por ejemplo, si el proceso se desarrolla en estado estacionario o no.

- ***Hidrofilicidad de los biopolímeros***

La teoría básica hasta aquí enunciada, asume que no existen interacciones entre el compuesto que difunde y el medio. Como se verá en el presente capítulo, la naturaleza química del material en cuestión juega un rol fundamental en las propiedades de transporte. En el caso de polímeros hidrofílicos, como los biopolímeros naturales (hidratos de carbono y proteínas), no se cumple el supuesto de no interacción. Estos biopolímeros presentan alto grado de polaridad a lo largo de las cadenas poliméricas por presencia de grupos como -OH y -COOCH₃, exhibiendo una gran cantidad de enlaces de hidrógeno. En particular, pueden fácilmente interaccionar con el agua, la cual es directamente absorbida a altas humedades relativas. La alta solubilidad del agua en este tipo de polímeros es la responsable de sus altas velocidades de permeación. Luego, esta absorción de agua afecta la interacción intermolecular entre cadenas, incrementando en gran medida la difusividad de muchas sustancias (Mc Hugh, 1994).

Ya que los modelos clásicos fueron desarrollados para matrices poliméricas no polares, es de esperar que los biopolímeros muestren comportamientos alejados de estos modelos. Las matrices hidrofílicas presentan nuevos desafíos que llevaron al desarrollo modelos alternativos, los cuales contemplan sus características particulares.

Un intento por clasificar la transferencia de masa a través de películas poliméricas, ha sido realizado teniendo en cuenta las velocidades relativas de movilidad de un penetrante y la relajación polimérica. Se ha visto además que los diferentes mecanismos de difusión son fuertemente dependientes de la temperatura de transición vítrea de los polímeros. Pueden mencionarse tres casos de difusión observados (McHugh y Krochta, 1994):

a) Caso I de difusión (Fickiana): las velocidades de difusión del penetrante son más bajas que las velocidades de relajación del polímero. Estos sistemas existen en un estado “gomoso”, por encima de su temperatura de transición vítrea, y por lo tanto, responden rápidamente a cambios en su condición física. El equilibrio de sorción es rápidamente establecido, y las condiciones de contorno dependientes del tiempo son independientes de la cinética de hinchamiento. Una forma de detectar este tipo de comportamiento, es a través de la determinación de la forma que toma la curva de sorción-tiempo. En este caso, la sorción es una función lineal de la raíz cuadrada del tiempo. Para tiempos largos, la curva de sorción se torna cóncava al eje de las abscisas. La cantidad de sustancia sorbida en el tiempo, puede ser descrita por Kt^n , donde n es igual a 0,5 en el caso Fickiano de difusión (Crank, 1968).

b) Caso II de difusión: Aquí la difusión es muy rápida comparada con la relajación polimérica. Estos sistemas existen en un estado “vítrea” ya que están, por debajo de su temperatura de transición vítrea. Por lo tanto, la movilidad del polímero no es lo suficientemente rápida como para permitir que el penetrante alcance la condición de equilibrio. Así, el proceso de sorción es fuertemente dependiente de la cinética de hinchamiento. Este caso puede ser utilizado para caracterizar la difusión a través de polímeros vítreos. No hay datos experimentales disponibles sobre la naturaleza del estado de equilibrio final de sorción en estos sistemas. La cantidad de sustancia sorbida en el tiempo, puede ser descrita por Kt^n , donde n es igual a 1 en el caso II.

c) Difusión anómala: ocurre cuando el penetrante difunde y el polímero relaja a velocidades comparables. Estos sistemas se encuentran entre los casos a) y b), con valor de n entre 0,5 y 1. Este tipo de difusión puede ocurrir en polímeros que son duros o vítreos, y desaparece por encima de la temperatura de transición vítrea. La sorción es afectada por la presencia de microcavidades “pre-existentes” en la matriz polimérica. Las isotermas de sorción resultantes contienen contribuciones aditivas de la ley de Henry y de la absorción de Langmuir.

- **Modelos de difusión con especial referencia a la liberación de sustancias activas**

Numerosas investigaciones, especialmente en el área farmacéutica, han desarrollado modelos de difusión para el caso de matrices sólidas que actúan como soporte de un compuesto activo (liberación de drogas) (Mulhbacher y col., 2004 y 2005; Dumoulin y col., 1998, Siepmann y col., 1999, Desai, 2005). En el campo de los alimentos, el creciente interés en los llamados “envases activos”, ha llevado, de la misma manera, a desarrollar modelos matemáticos que permitan simular el efecto de los parámetros de diseño de un material en el desempeño de los sistemas de liberación (Giannakopoulos y Guilbert, 1986; Han y Floros, 1998 y 1997; Ozdemir y Floros, 2001; Choi y col. 2005). La mayoría de estos modelos matemáticos tienen en cuenta la difusión del penetrante dentro de una placa plana, el hinchamiento y disolución del polímero y la liberación de un compuesto dentro de un medio líquido externo.

En el caso específico de películas comestibles soporte de antimicrobianos y elaboradas con almidón, su capacidad para sorber agua puede tener un pronunciado efecto en la cinética de liberación del antimicrobiano. Al contacto con sistemas acuosos, el agua difunde dentro de la película, resultando en la relajación de la cadena polimérica con la consecuente expansión de volumen (hinchamiento). Luego, el aditivo se disuelve y difunde fuera del sistema (Siepmann y col., 2002).

En el presente capítulo se estudiará la liberación del sorbato de potasio a partir de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca, y se propondrá un modelo matemático que permita describir el efecto de los distintos métodos de fabricación y del pH del medio receptor en la cinética de liberación del sorbato. El modelo propuesto (descrito en la sección 2.2.2.2) consiste de dos partes: el primero describe la cinética de ganancia de agua y la segunda describe la liberación del agente antimicrobiano desde la matriz polimérica.

2.1.5 **Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias activas**

2.1.5.1 **Ensayos en medio líquido**

La biodisponibilidad de los preservadores presentes en las películas, puede determinarse estudiando la supervivencia de un microorganismo de interés que ha sido inoculado en un medio de cultivo apropiado, expresando la misma como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mL (log UFC/mL), o bien midiendo su densidad óptica (Li y col., 2002).

Se obtienen así curvas de crecimiento o muerte microbiana, que permitirán inferir las propiedades de movilidad del preservador y su capacidad para actuar como agente antimicrobiano cuando las películas están en contacto con un medio líquido.

Por esta técnica, Chung y col. (2001) estudiaron la efectividad de la liberación de propilparabeno a partir de un cobertura polimérica sobre el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, y observaron una continua inhibición del crecimiento de la levadura. Por otro lado, Li y col. (2002) confirmaron una actividad antibacteriana satisfactoria contra *Escherichia coli* cuando analizaron películas elaboradas con mezclas de quitosano y celulosa.

A pesar de que estos resultados pueden sugerir una potencial aplicación de las películas a alimentos, más ensayos deben ser llevados a cabo sobre alimentos modelo o alimentos reales para confirmar dicha posibilidad.

2.1.5.2 **Ensayos en medio sólido**

La técnica más explorada en cuanto a disponibilidad de un antimicrobiano en medio sólido, es la determinación de las zonas de inhibición (halos) en el desarrollo de un microorganismo seleccionado, que ha sido sembrado en la superficie de un medio de cultivo conveniente.

Con este objetivo, se aplican sobre la superficie inoculada, discos de película conteniendo el preservador y se procede a la incubación a la temperatura adecuada para el desarrollo del microorganismo control. Luego, se observan las zonas claras de no crecimiento alrededor de los discos de película, indicadoras de la actividad del antimicrobiano y/o de su difusión desde la película hacia el agar.

Numerosos autores han reportado la efectividad de antimicrobianos a través de esta técnica. Padgett y col (1998; 2000) incorporaron lisozima o nisina a películas biodegradables y verificaron la inhibición del crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. El benzoato de sodio y el sorbato de potasio, adicionados a una cobertura a base de metilcelulosa y quitosano, mostraron propiedades antifúngicas contra *Penicillium notatum* y *Rhodotorula rubra* de acuerdo a lo reportado por Chen y col. (1996). Pranoto y col. (2005) analizaron la actividad antimicrobiana de películas de quitosano portadoras de aceite esencial de ajo, sorbato de potasio o nisina contra varios microorganismos patógenos (*E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*) y establecieron los niveles mínimos de efectividad.

Se desea señalar que la utilidad del ensayo del halo para cuantificar la actividad antimicrobiana, dependerá de las características difusionales del agente

antimicrobiano. Es decir, la no visualización de una zona clara de inhibición, no indica necesariamente que el antimicrobiano estudiado no sea efectivo contra el microorganismo de prueba, sino que podría indicar una posible falta de propiedades difusionales adecuadas para este ensayo.

Otro aspecto a tener en cuenta, en ambos tipo de ensayos, es la elección del microorganismo de prueba. Este debe ser representativo de la degradación microbiológica comúnmente hallada en el alimento de interés; o bien, ser de conocida sensibilidad al antimicrobiano en estudio.

En el presente trabajo, se utilizó la levadura *Zygosaccharomyces bailii*, la cual tiene excepcional tolerancia a: preservadores, alto contenido de azúcar, elevada acidez y regímenes de pasteurización (Thomas y Davenport, 1985). Esta levadura ha sido capaz de crecer incluso a pH 3,0 en presencia de 250 mg/L de ácido sórbico (Praphailong y Fleet, 1997).

En general, los productos contaminados por *Z.bailii* tienen bajo pH, baja actividad de agua, contienen suficientes cantidades de azúcares fermentables y/u otros compuestos carbonados asimilables (por ejemplo, alcohol, glicerol y ácido acético), una fuente de nitrógeno, una fuente de vitaminas esenciales del grupo B y preservadores tales como los ácidos acético, benzoico y sórbico ó dióxido de azufre. La naturaleza y extensión del deterioro causado varían con la composición química, las condiciones físicas de envasado y el almacenamiento de cada producto. Las modificaciones sensoriales incluyen cambios de color, formación de aerosoles, carbonatación y off-flavor por producción de H₂S, ácido acético y ésteres frutados (Thomas y Davenport, 1985).

Debido a las características mencionadas de esta levadura, es de suma utilidad su empleo en estudios de efectividad antimicrobiana de preservadores, a fin de establecer las condiciones que minimicen su crecimiento, y de esta forma garantizar la adecuada estabilidad microbiológica de los alimentos.

2.1.6 Interacciones biopolímero - sustancia activa. Su efecto en la liberación y biodisponibilidad de sustancias activas

Al seleccionar un agente antimicrobiano para ser incorporado en la formulación de películas comestibles, deben considerarse sus posibles interacciones con el material polimérico, alimento y medio ambiente. Su solubilidad y polaridad pueden también

determinar su compatibilidad con el sistema de cobertura. La estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento también juegan un rol importante.

La reducción del nivel de antimicrobiano en las películas debido a la difusión hacia el interior del alimento o debido a su degradación, debe ser tenida en cuenta al diseñar una película portadora de antimicrobianos (Vodjani 1989a, 1989b, 1990; Gliemmo y col., 2004).

Devlieghere y col, (2004) reportaron que la actividad antimicrobiana de coberturas de quitosano, fue negativamente afectada por la incorporación de almidón, proteínas del suero láctico y NaCl a la formulación. Así mismo, Ofman y col. (2004) revelaron la existencia de interacciones entre almidón de mandioca y preservadores como sorbato de potasio y benzoato de sodio, debido a cambios registrados en las propiedades mecánicas y comportamiento sorcional de las mezclas.

2.1.6.1 Efecto del método de fabricación empleado en la elaboración de las películas

Como se describió en el Capítulo 1, las condiciones de proceso utilizadas en la elaboración de películas comestibles, determinan las propiedades físico-químicas de las mismas. La cohesividad, densidad y el grado de cristalinidad, son algunas de las características de las películas que pueden condicionar la biodisponibilidad del preservador. Dichas propiedades, podrían afectar el grado de retención o controlar la velocidad de liberación de las sustancias activas, etc. Por otro lado, la degradación del antimicrobiano puede verse más o menos favorecida dependiendo del proceso de elaboración empleado.

2.1.7 Objetivos

En el presente capítulo se estudió la liberación y la biodisponibilidad de los sorbatos contenidos en películas comestibles elaboradas en base a almidón de mandioca y glicerol, analizando la influencia del método de fabricación empleado en dichas propiedades. Para ello se procedió a:

- ✓ Estudiar la cinética de liberación en medio líquido y sólido, de los sorbatos soportados en las películas
- ✓ Evaluar el efecto de los distintos métodos de fabricación y del pH del medio receptor en el mecanismo de liberación del KS y en su cinética.

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana del KS soportado en las películas hacia *Zygosaccharomyces bailii* en medios líquidos
- ✓ Determinar las propiedades de barrera contra la contaminación externa por *Z.bailii* de las películas estudiadas
- ✓ Evaluar el uso potencial de estas películas como factor de estrés microbiano, para controlar el crecimiento microbiano y prolongar la vida útil de alimentos

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3 Elaboración de las películas

La elaboración de las películas por diferentes métodos de fabricación, ha sido descrita en el Capítulo 1, sección 1.2.1.2.

2.2.2 Evaluación de la liberación del sorbato de potasio soportado en películas comestibles

2.2.2.1.1 Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso

Se estudió la cinética de liberación del sorbato de potasio (KS) a medios líquidos de pH 3,0 ó 4,5. En el caso de la película fabricada con el método 3, la liberación también fue evaluada a pH 6,0.

a) Metodología empleada para evaluar la cinética de liberación del sorbato de potasio

Veintidós discos de película de 1,3 - 1,4 cm de diámetro, de cada tipo de película, los cuales pesaron aproximadamente 1,3 g fueron introducidos asépticamente en frascos erlenmeyers de 250 mL vacíos y estériles. A continuación se adicionaron en forma aséptica, 100 mL de caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) cuyo pH fue ajustado a 3,0, 4,5 ó 6,0 con ácido cítrico (50%, m/m). Los caldos se encontraban inoculados con 0,1 mL de un inóculo de *Z.bailii* de 3-5 10⁶ UFC/mL.

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de vidrio conectado a un pHmetro Solution Analyzer 5800-05 (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00 (Anedra, Argentina). El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades de pH.

Los frascos fueron agitados a 150 RPM utilizando un agitador orbital (Shaker Pro, Vicking S.A., Argentina) durante 7 días a 25°C. A fin de estudiar la cinética de liberación del preservador, alícuotas de caldo fueron extraídas asépticamente a tiempos seleccionados a largo de 120 horas. Al principio del ensayo, los intervalos de tiempo de muestro fueron muy cortos (0,5, 1,5, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240 y 360 minutos), mientras que a partir de las 24 horas, fueron más prolongados (24, 48, 72, 120 horas). Estas alícuotas fueron centrifugadas 10 minutos a 3000 RPM y a temperatura ambiente, para remover las levaduras. Se determinó la concentración de KS del sobrenadante en cada alícuota.

La técnica empleada para la determinación del antimicrobiano ha sido detallada en el capítulo 1 (sección 1.2.2.6), pero en este caso se colocó en el portamuestra un volumen de muestra de 0,5 ó 1,0 mL y se llevó el volumen final de destilado a 250 mL debido a la concentración del preservador en el sistema a dosar.

Se llevó a cabo un ensayo control usando un caldo no inoculado, a fin de evaluar si el crecimiento de las levaduras influenciaba la liberación del KS.

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

b) **Cálculo de la fracción de sorbato de potasio liberada**

Una vez que la concentración de KS en cada alícuota fue determinada a cada tiempo ($[KS]_t$ en $\mu\text{g/mL}$), se calculó la cantidad de antimicrobiano ($M_{KS\ t}$, en μg de KS) contenida en el volumen total de caldo receptor (100 mL) según:

$$M_{KS\ t} = [KS]_t \times 100\ \text{mL}$$

A cada tiempo se tuvo en cuenta la reducción del volumen total de caldo debido a las alícuotas retiradas (0,5 o 1 mL), a fin de efectuar una corrección en el valor de $[KS]_t$ determinado.

Por otro lado, el contenido de KS de las películas obtenidas a través de distintos métodos de fabricación, fue determinado a tiempo cero ($[KS]_P$ en $\mu\text{g/g}$). Con este dato y teniendo en cuenta la masa de películas introducidas en el caldo (P, en g), se calculó la masa total de antimicrobiano incorporada al medio líquido a tiempo cero ($M_{KS\ T}$ en μg de KS) según:

$$M_{KS\ T} = [KS]_P \times P$$

La fracción de KS liberada al medio líquido a cada tiempo se obtuvo calculando el cociente entre:

$$M_{KS\ t} / M_{KS\ T}$$

Finalmente, se obtuvieron los perfiles de liberación del antimicrobiano a partir de películas fabricadas con distintos métodos y sumergidas en caldo Sabouraud con pH ajustado a 6,0, 4,5 o 3,0, graficando $M_{KS\ t} / M_{KS\ T}$, en función del tiempo.

c) Modelado de las curvas de liberación

Los datos de la liberación de sorbato a un medio líquido pudieron ser ajustados a un modelo de cinética de primer orden:

$$Q_t = Q_{\text{inf}} (1 - e^{-kt})$$

donde Q_t puede definirse como: $Q_t = \frac{M_{KS_t}}{M_{KST}}$, fracción de sorbato liberada a tiempo t , y

Q_{inf} como: $Q_{\text{inf}} = \frac{M_{KS_{\text{inf}}}}{M_{KST}}$, fracción de sorbato liberada cuando las condiciones de

equilibrio fueron alcanzadas, $M_{KS_{\text{inf}}}$ es la cantidad de preservador liberado en el equilibrio y k es la constante cinética de primer orden.

2.2.2.2 Estudio del mecanismo de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso. Propuesta de un modelo matemático.

La difusión de compuestos de bajo peso molecular en polímeros es generalmente gobernada por dos fenómenos que ocurren simultáneamente:

- un fenómeno substancialmente estocástico (relacionado con el movimiento Browniano), donde el penetrante fluye exclusivamente conducido por un gradiente de concentración
- un fenómeno de relajación provocado por la tendencia del sistema a absorber cantidades de una sustancia penetrante hasta alcanzar la condición de equilibrio (Del Nobile y col., 1994).

Cuando la transferencia de masa tiene lugar en una matriz polimérica esencialmente no perturbada, como es el caso de la difusión de gases en polímeros amorfos (o en todo caso donde la interacción inducida por el solvente es despreciable), el proceso de difusión es substancialmente controlado por un fenómeno estocástico. El comportamiento opuesto, es encontrado cuando una delgada plancha del polímero es puesta en contacto con un penetrante que interacciona con la matriz produciendo hinchamiento. En este caso el tiempo característico de difusión es mucho más corto que el tiempo de relajación del polímero y, por lo tanto, la relajación polimérica se vuelve el fenómeno limitante que controla la cinética de incorporación del solvente (Del Nobile y col., 1994). Investigaciones previas relacionadas con la liberación de

compuestos activos desde polímeros hidrofílicos en solución acuosa, como es el caso del presente trabajo, revelaron que las observaciones experimentales se encuentran entre estos dos fenómenos limitantes (Buonocore y col., 2003,b).

Pueden encontrarse en la literatura varias aproximaciones teóricas que tienen en cuenta, en forma cuantitativa, estos dos aspectos distintivos de la difusión de materia (Buonocore y col., 2003,a; Del Nobile y col., 1996; Del Nobile y Massera, 2000). Una de las formas más simples de combinarlos, es la superposición lineal de los mecanismos descritos:

$$M(t) = M_F(t) + M_R(t) \quad (1)$$

donde, $M(t)$ es tanto la cantidad total de agua absorbida o la cantidad total de compuesto activo liberado a tiempo t ,

$M_F(t)$ es la contribución debido al fenómeno estocástico, ya sea de la cantidad de agua absorbida o de la cantidad de compuesto activo liberado, al tiempo t ,

$M_R(t)$ es la contribución debido al fenómeno de relajación polimérica, ya sea de la cantidad de agua absorbida o de la cantidad de compuesto activo liberado, al tiempo t .

El transporte de masa relacionado con el movimiento Browniano, es descrito generalmente por medio del modelo de Fick. En el caso específico de difusión a través de una placa plana con condiciones de contorno constantes (Choi y col., 2005; Ozdemir y Floros, 2001; Guilbert y col., 1985), la solución de la segunda ley de Fick es:

$$M_F(t) = M_F^{eq} \cdot \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \cdot \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2 \cdot n + 1)^2} \cdot \exp \left\{ - D \cdot (2 \cdot n + 1)^2 \cdot \pi^2 \cdot \frac{t}{\ell^2} \right\} \right\} \quad (2)$$

donde, M_F^{eq} es tanto la cantidad de compuesto de bajo peso molecular absorbido o liberado en el equilibrio, D es la difusividad del compuesto de bajo peso molecular y ℓ es el espesor de la película.

La relajación polimérica esta conducida por la distancia que separa al sistema del equilibrio de absorción. Esto puede ser cuantitativamente descrito a través de una ecuación que describe una cinética de primer orden:

$$M_R(t) = M_R^{eq.} \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (3)$$

donde $M_R^{eq.}$ es tanto la cantidad de compuesto de bajo peso molecular absorbido o liberado en el equilibrio, τ es el tiempo de relajación asociado a la relajación del polímero.

Sustituyendo las ecuaciones (2) y (3) en la ecuación (1), se obtiene la siguiente expresión:

$$M(t) = M_F^{eq.} \cdot \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \cdot \sum_{n=0}^{n=\infty} \frac{1}{(2 \cdot n + 1)^2} \cdot \exp\left[-D \cdot (2 \cdot n + 1)^2 \cdot \pi^2 \cdot \frac{t}{\ell^2}\right] \right\} + M_R^{eq.} \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (4)$$

Definiendo X_F como el cociente entre la $M_F^{eq.}$ y $M^{eq.}$, la ecuación (4) puede ser reordenada de la siguiente forma:

$$M(t) = M^{eq.} \cdot \left\{ X_F \cdot \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \cdot \sum_{n=0}^{n=\infty} \frac{1}{(2 \cdot n + 1)^2} \cdot \exp\left[-D \cdot (2 \cdot n + 1)^2 \cdot \pi^2 \cdot \frac{t}{\ell^2}\right] \right\} \right\} + M^{eq.}(1 - X_F) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (5)$$

donde $M^{eq.} = M_F^{eq.} + M_R^{eq.}$

La ventaja de reordenar la ecuación (4) y obtener así la ecuación (5), se basa en el hecho de que X_F es una medida de la desviación del mecanismo de transporte del comportamiento ideal Fickiano. De hecho, por definición X_F toma valores entre 0 y 1: para X_F igual a 1, la ecuación (5) es la solución de la segunda ley de Fick, mientras que para X_F igual a 0, se obtiene difusión anómala.

- **Metodología empleada para evaluar el modelo**

Como se mencionó en los apartados anteriores, el modelo propuesto para el mecanismo por el cual el KS es liberado a un medio acuoso, comprende dos procesos principales:

- la cinética de absorción de agua como solvente y consecuente relajación del biopolímero (hinchamiento)
- la liberación del KS desde la matriz polimérica a dicho medio acuoso

i) **Cinética de absorción de agua**

A fin de evaluar la cinética de absorción de agua (hinchamiento), se sumergieron discos de 1,3 cm de diámetro en 30 mL de caldo Sabouraud cuyo pH fue ajustado a 4,5 o 3,0 con ácido cítrico. Se determinó la ganancia de peso de las películas hidratadas a tiempos seleccionados, luego de eliminar el exceso de agua superficial con un papel tissue, hasta que la condición de equilibrio fue alcanzada. El ensayo se realizó bajo agitación (150 RPM) a 25°C.

Se calculó la fracción de hinchamiento según:

$$\frac{g \text{ película hidratada}_{(t)} - g \text{ película antes de la inmersión}_{(t=0)}}{g \text{ película antes de la inmersión}_{(t=0)}} = \\ = \frac{g \text{ agua}(t)}{g \text{ película antes de la inmersión}_{(t=0)}}$$

Se informa el promedio de dos determinaciones.

ii) **Cinética de liberación del sorbato de potasio**

El procedimiento seguido en este caso, fue similar al descrito en la sección 2.2.2.1 ítem a. En este caso la concentración de sorbato liberado a cada tiempo fue expresada como g KS / g película.

2.2.2.3 **Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio semisólido**

Se estudió la cinética de liberación del KS a un alimento modelo semisólido de actividad de agua (a_w) 0,98 y pH 4,5. Se emplearon películas elaboradas con los tres métodos estudiados.

a) **Metodología empleada para evaluar la cinética de liberación del sorbato de potasio**

Con el objeto de estudiar la difusión del preservador a un alimento modelo semisólido, discos de película de 1 cm de diámetro fueron cortados con un sacabocados, pesados en balanza analítica (aproximadamente 0,03 g cada disco) y apoyados sobre la superficie de 8 mL de agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) contenido en placas plásticas de petri de 5,5 cm de diámetro.

La a_w del agar fue deprimida a 0,98 mediante el agregado de glucosa y el pH fue ajustado a 4,5 con ácido cítrico 50% (m/m). Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 horas.

El pH se controló sobre el agar previamente fundido (45°C), empleando un electrodo de vidrio. El pHmetro utilizado fue calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00 (Anedra, Argentina).

La a_w se midió a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, WA, USA). Previamente a la medición de la actividad de agua del agar, se realizó una curva de calibración con soluciones salinas saturadas. El error en la determinación de la actividad de agua fue de 0,005 unidades.

A intervalos de tiempo seleccionados (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 48 horas), se retiraron las películas de la superficie del agar (por duplicado) y se determinó la cantidad de KS transferida al agar.

La técnica empleada para la determinación del antimicrobiano ha sido detallada en el Capítulo 1 (sección 1.2.2.6).

a) ***Cálculo de la fracción de sorbato de potasio liberada***

Una vez que la concentración de KS inicial en cada tipo de película fue determinada ($[KS]_p$ en $\mu\text{g/g}$), y teniendo en cuenta el peso inicial de los discos (P_{di} en g), se calculó la cantidad de antimicrobiano ($M_{KS\ p\ i}$, en μg de KS) contenida en dicha película a tiempo cero, según:

$$M_{KS\ p\ i} = [KS]_p \times P_{di}$$

Además, una vez determinada la concentración de KS en el agar a cada tiempo ($[KS]_{At}$ en $\mu\text{g/g}$), y luego de establecer el peso de los agares (P_{At} en g), se calculó la cantidad de antimicrobiano transferida al medio semisólido ($M_{KS\ A\ t}$, en μg de KS) según:

$$M_{KS\ A\ t} = [KS]_{At} \times P_{At}$$

La fracción de KS liberada al medio semisólido, a cada tiempo, se obtuvo calculando el cociente entre:

$$M_{KS \text{ A t}} / M_{KS \text{ P i}}$$

Finalmente se obtuvieron los perfiles de transferencia del antimicrobiano, a partir de películas fabricadas con distintos métodos y en contacto con la superficie de agar Sabouraud con a_w deprimido a 0,98 y pH ajustado 4,5, graficando $M_{KS \text{ A t}} / M_{KS \text{ P i}}$ en función del tiempo.

b) Modelado de las curvas de liberación

Los datos de la liberación de sorbato a un medio semisólido fueron ajustados a un modelo de cinética de primer orden, de igual manera que la detallada para el medio líquido (sección 2.2.2.1 c), con la salvedad de que en este caso

$$Q_t = \frac{M_{KS \text{ A t}}}{M_{KS \text{ P i}}} \quad \text{y} \quad Q_{\text{inf}} = \frac{M_{KS \text{ A inf}}}{M_{KS \text{ P i}}}$$

donde $M_{KS \text{ inf}}$ es la cantidad de KS liberado al medio semisólido en el equilibrio.

2.2.2.4 Tratamiento matemático de los datos y análisis estadístico

- **Cinética de liberación del sorbato de potasio**

Los valores de Q_{inf} y k , fueron obtenidos a través de un análisis de regresión no lineal de los datos de liberación del antimicrobiano con el tiempo. A fin de establecer diferencias significativas entre los parámetros mencionados, tanto en medio acuoso como en medio semisólido, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) y, *a posteriori*, el test de Tukey. La significatividad estadística fue evaluada a un nivel de confianza, α , de 0,05. Para efectuar estos análisis se utilizó el programa Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, 1997 (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A).

- **Mecanismo de liberación del sorbato de potasio**

En el estudio del mecanismo de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso se usó el utilitario MATHLAB 95 1.0 (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, U.S.A). La bondad del ajuste fue evaluada en base a la diferencia relativa porcentual de acuerdo a lo propuesto por Boquet y col. (1978).

2.2.3 Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio

Se estudió la efectividad del KS contenido en las películas a través de dos perspectivas: 1- en contacto de las películas con un medio líquido inoculado, en el cual el sorbato es liberado, evaluando su eficiencia para inhibir el crecimiento microbiano; 2- en contacto con un alimento modelo semisólido de alta a_w determinando su accionar como barrera a la contaminación externa.

La actividad antimicrobiana de las películas fue evaluada usando como microorganismo indicador *Zygosaccharomyces bailii*, una levadura deteriorativa reconocida por su resistencia a los preservadores (Warth A.D., 1977).

Se analizó la influencia de los diferentes métodos de fabricación ensayados en el desempeño de los sorbatos.

2.2.3.1 Preparación del inóculo

Se preparó un inóculo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 tomando una ansada a partir de una estría de la levadura y resuspendiendo la carga en 10 mL de caldo Sabouraud. Se incubó a 25°C durante 24 horas, momento en el que el microorganismo alcanza la fase estacionaria temprana de crecimiento (aproximadamente $5 \cdot 10^6$ UFC/mL).

2.2.3.2 Efectividad del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano

El procedimiento aplicado fue similar al descrito para el estudio de la cinética de liberación del antimicrobiano a un medio líquido (sección 2.2.2.1), con el adicional de que cada sistema fue inoculado con 0,1 mL de un inóculo de *Z.bailii* de $3-5 \cdot 10^6$ UFC/mL obteniéndose una carga inicial de microorganismos de, aproximadamente, $3-5 \cdot 10^3$ UFC/mL. Todos los sistemas fueron incubados a 25°C en cámara con convección forzada de aire y bajo agitación (150 RPM). A tiempos seleccionados (0, 5, 10, 22, 26, 30, 48, 54, 72, 96, 144 y 168 horas), alícuotas de caldo fueron retiradas en forma aséptica de los erlenmeyers, por duplicado, para el correspondiente recuento de *Z.bailii* y posterior construcción de la curva de crecimiento.

Un ensayo análogo fue llevado a cabo con películas sin preservador, a fin de evaluar el efecto de otros componentes de las películas y/o del medio sobre el crecimiento de la levadura.

A fin de comparar la influencia en el crecimiento microbiano del sorbato liberado desde la película durante el almacenamiento, con el agregado directo del antimicrobiano al medio de cultivo, la cantidad de sorbato liberado en condiciones de equilibrio fue determinado para cada película estudiada y esta cantidad fue adicionada,

como KS, a tiempo cero a 100 mL de caldo Sabouraud inoculado. Como antes, alícuotas de caldo fueron retiradas a tiempos seleccionados, por duplicado, para el recuento de *Z.bailii*.

- **Modelado de las curvas de crecimiento en medio líquido**

Las curvas de crecimiento fueron modeladas aplicando la ecuación de Gompertz (McMeekin y col., 1993):

$$y = N_0 + C \left\{ \exp \left[- \exp \left(\frac{2,78\mu}{C} \right) (lag - t) + 1 \right] \right\}$$

Esta ecuación expresa el cambio de la población de microorganismos (y , log UFC/mL) en función del tiempo (t). Los parámetros biológicos de crecimiento de la levadura son: la velocidad de crecimiento específica (μ), el tiempo de retardo antes del crecimiento o fase de latencia (lag) y la máxima población alcanzada en la fase estacionaria. Esta última puede calcularse como la suma ($N_0 + C$), siendo C la diferencia entre el número de células final e inicial (N_0).

En el caso de producirse muerte de microorganismos, se determinó la velocidad de reducción del recuento mediante un ajuste lineal de los puntos experimentales.

Se estimaron los parámetros de crecimiento mediante un análisis de regresión no lineal de los datos utilizando la ecuación de Gompertz. Para los casos de reducción de la población, se realizó un análisis de regresión lineal. Para establecer las diferencias significativas entre los parámetros obtenidos para todos los sistemas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y, *a posteriori*, el test de Tukey. La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$).

Los análisis de regresión y estadístico fueron realizados utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, 1997 (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A).

2.2.3.3 **Efectividad de películas conteniendo sorbato de potasio como barrera a la contaminación externa**

a) **Desempeño como barrera antimicrobiana de las películas**

En estos ensayos se estudió la habilidad de las películas comestibles conteniendo KS para prevenir la contaminación externa. Para este propósito, discos de 1 cm de diámetro de película con y sin sorbato fueron asépticamente cortados, pesados en balanza analítica y colocados sobre una superficie estéril (placas plásticas estériles de 9

cm de diámetro). A continuación, los discos fueron sembrados con 10 μ L de un inóculo de *Z.bailii* conteniendo, aproximadamente, 5.10^6 UFC/mL. La incubación de los sistemas fue realizada a 25°C durante 24 horas en cámara de convección forzada.

b) Desempeño como barrera antimicrobiana de películas usadas como recubrimiento de un alimento modelo semisólido

A fin de estudiar la habilidad de las películas para prevenir la contaminación microbiana en un producto de alta a_w , se deprimió la a_w del agar Sabouraud a 0,98 mediante el agregado de glucosa y se ajustó el pH a 4,5 con gotas de una solución de ácido cítrico 50% (m/m), con el objetivo de simular este tipo de productos.

Discos de película con y sin sorbato de 1 cm de diámetro fueron cortados asépticamente con un sacabocados, pesados en balanza analítica, y posteriormente apoyados sobre la superficie del agar (8 mL de agar Sabouraud en placas de petri de 5,5 cm de diámetro). Luego se sembraron 10 μ L de un inóculo de *Z.bailii* conteniendo, aproximadamente, $3-5.10^6$ UFC/mL sobre la superficie de los discos de películas. Todas las muestras fueron incubadas a 25°C en cámara de convección forzada por 48 horas.

En ambos ensayos (*a* y *b*), los discos de película conteniendo la carga microbiana fueron retirados asépticamente a tiempos seleccionados (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas por duplicado en *a*, ó 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30 y 48 horas por triplicado en *b*) de la superficie de la placa o del agar respectivamente. Dichos discos fueron sumergidos en 1 mL de agua peptona estéril (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), contenido en tubo de vidrio corto (16 mm de diámetro x 100 mm de altura), y el sistema fue agitado en vortex (MS 1 Minishaker, IKA - Works INC., USA) durante 2 minutos a 2500 RPM para resuspender al microorganismo. A continuación, se realizó el recuento de viables a partir de esta nueva suspensión de levaduras. Posteriormente, se construyeron las correspondientes curvas de crecimiento expresando la carga microbiana, a cada tiempo, como UFC/g de película.

2.2.3.4 Recuento de *Zygosaccharomyces bailii*

En todos los ensayos microbiológicos, el recuento de *Z.bailii* fue efectuado por plaqueo en la superficie de agar Sabouraud. Las placas se incubaron a 25°C, en cámara de convección forzada, durante 5 días antes del recuento.

2.2.4 Estudio de la interacción química entre el sorbato de potasio y la matriz amilácea

- ***Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)***

La espectrometría FT-IR fue empleada para determinar las posibles interacciones entre el almidón y el KS, en las películas estudiadas.

Se determinó la transmitancia espectral entre 400 y 4000 cm^{-1} , del KS en polvo, de películas de almidón de mandioca libres del antimicrobiano y de películas de almidón de mandioca conteniendo sorbato (sin el agregado de glicerol a fin de eliminar potenciales interferencias).

Para la obtención de los espectros, el sorbato de potasio en polvo fue dispersado en KBr seco (técnica de pastilla) y las muestras de película fueron medidas por la técnica de reflexión total atenuada (ATR) sobre un cristal de ZnSe a 45°.

El equipo utilizado fue un espectrofotómetro FT-IR marca Nicolet 510 P (Termo Electro Corporation, Waltham, MA, USA). Las mediciones fueron realizadas a 25°C y 50% de H.R.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Evaluación de la liberación del sorbato de potasio soportado en películas comestibles

2.3.1.1 Estudio de la cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso

La Figura 2.2, paneles A, B y C, muestra la liberación del sorbato de potasio (KS) desde películas elaboradas con almidón de mandioca y glicerol, obtenidas por diferentes métodos de fabricación, a un caldo Sabouraud inoculado con *Zygosaccharomyces bailii* y con pH 6,0, 4,5 ó 3,0.

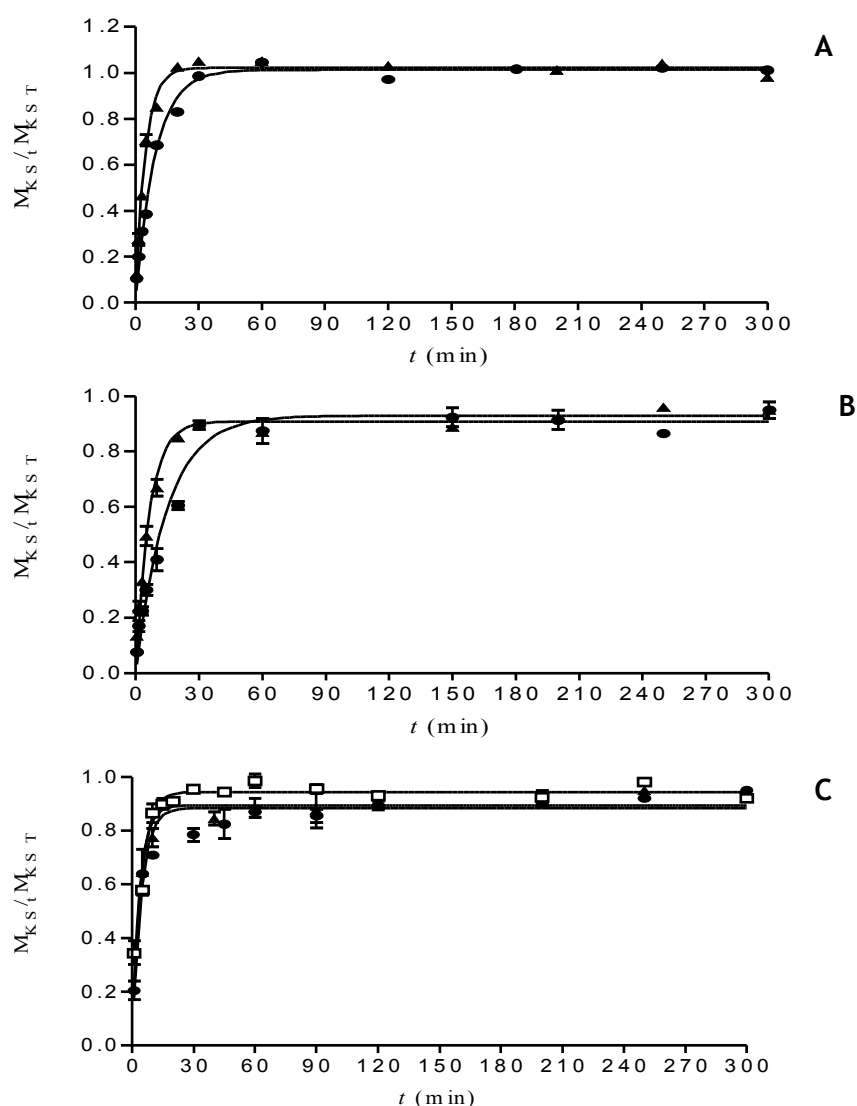


Figura 2.2 Liberación de KS desde películas comestibles. Panel A: método 1, Panel B: método 2, Panel C: método 3. \square pH 6.0; \blacktriangle pH 4.5; \bullet pH 3.0. M_{KS_t} : cantidad de KS liberado a tiempo t ; M_{KS_T} : cantidad total de KS contenida en la película a tiempo cero. — Ajuste cinético de primer orden.

Los resultados obtenidos indican que luego de aproximadamente 30 minutos de contacto, la cantidad de sorbato liberado a tiempo t ($M_{KS,t}$) dividida por la cantidad total de sorbato contenida en la película a tiempo cero ($M_{KS,0}$) fue siempre superior a 0,8, independientemente del pH del caldo. La liberación fue entonces rápida: después de 5 minutos de exposición, más del 50% del preservador había sido liberado hacia el caldo, en general de todas las películas ensayadas. La misma tendencia fue informada para la liberación de sorbato a partir de películas elaboradas con κ -carragenano por Choi y col. (2005). Es importante mencionar, que tan elevada velocidad de liberación podría reducir el efecto de barrera antimicrobiana de las películas durante un almacenamiento prolongado. Buonocore y col. (2003) reportaron que es posible controlar la liberación de agentes antimicrobianos al agua cuando se modifica el grado de entrecruzamiento de laminados de polivinilalcohol. Asimismo, los cambios en la composición de las películas pueden también ayudar a controlar la liberación del preservador. Por ejemplo, Ozdemir y Floros (2001) reportaron que la incorporación de distintos niveles de cera de abeja a la formulación de películas en base a un aislado proteico del suero láctico, glicerol y KS, modificaron el valor del coeficiente de difusión del antimicrobiano en un medio líquido.

También se puede observar en la Figura 2.2 que la cantidad de sorbato liberado desde las películas creció con el tiempo hasta que se alcanzó un valor asintótico.

Los datos de la liberación de sorbato pudieron ser aproximados a un modelo cinético de primer orden y los valores de los parámetros cinéticos Q_{inf} y k , fueron obtenidos por análisis de regresión no lineal para las diferentes películas estudiadas. Los resultados se muestran en la Tabla 2.1 y las curvas correspondientes pueden apreciarse en la Figura 2.2.

El análisis estadístico realizado por ANOVA mostró que el método aplicado para preparar las películas afectó significativamente ($\alpha: 0,5$) la cinética de liberación del KS, como se explica a continuación en el análisis de los parámetros Q_{inf} y k .

▪ **Análisis del parámetro Q_{inf}**

Pudo observarse que las películas obtenidas con el método 1 presentaron el mayor valor de Q_{inf} . Por el contrario, las películas obtenidas con el método 2 y método 3 liberaron una fracción similar de KS a pH 4,5 y estas fracciones fueron menores que la liberada por las películas elaboradas con el método 1. Para pH 3,0 los valores de Q_{inf} obtenidos siguieron el orden: método 1 > método 2 > método 3.

De acuerdo a resultados reportados en el capítulo 1, sección 1.3.2, las películas elaboradas con almidón de mandioca y conteniendo sorbato presentaron una cristalinidad que difería según el método de fabricación empleado, disminuyendo en el

siguiente orden: método 1 \cong método 2 > método 3. La menor cristalinidad observada cuando el método 3 fue utilizado es, probablemente, una consecuencia de los tiempos más cortos de calentamiento y secado (Arvanitoyannis, 1998a y b; Biliaderis, 1994). Como resultado de ello, menor cantidad de grupos -OH del almidón estarían involucrados en enlaces tipo puente de H intermoleculares y, por lo tanto, más disponibles para otras interacciones (Dumoulin y col., 1998).

Tabla 2.1 Efecto de la técnica de gelatinización / secado empleada para elaborar películas comestibles en base a almidón de mandioca, sobre los parámetros cinéticos de la liberación de KS a un caldo con pH ajustado.

Método de fabricación ⁱ	pH del caldo	[KS] en el equilibrio (g/L)	Q_{inf}^{ii}	k (min ⁻¹) ⁱⁱ	R^2
Método 1	3,0	0,387 ± 0,003	1,012 ± 0,010 ^a	0,107 ± 0,005 ^d	0,9900
	4,5	0,454 ± 0,005	1,021 ± 0,011 ^a	0,212 ± 0,009 ^{b, c}	0,9897
Método 2	3,0	0,481 ± 0,007	0,930 ± 0,017 ^b	0,068 ± 0,006 ^d	0,9659
	4,5	0,464 ± 0,009	0,909 ± 0,017 ^{b, d}	0,154 ± 0,010 ^c	0,9803
Método 3	3,0	0,422 ± 0,005	0,884 ± 0,012 ^c	0,231 ± 0,030 ^a	0,9230
	4,5	0,423 ± 0,007	0,894 ± 0,019 ^{c, d}	0,267 ± 0,038 ^{a, b}	0,8111
	6,0	0,448 ± 0,004	0,944 ± 0,012	0,236 ± 0,022 ^a	0,9100

ⁱ Concentración de KS inicial en las películas: método 1, 30,33 g/kg; método 2, 32,16 g/kg; método 3, 36,55 g/kg.

ⁱⁱ Se informa el mejor valor ajustado y su error estándar. Valores seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

R^2 : bondad del ajuste (Statgraphics, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland).

Q_{inf} : cociente entre $M_{KS\ inf}$, y M_{KST} . $M_{KS\ inf}$, es la cantidad de KS liberada en el equilibrio y M_{KST} es la cantidad de KS contenida en la película a tiempo cero.

k : constante cinética de primer orden.

Bajo tales condiciones, los sorbatos podrían tener más posibilidades de formar complejos que involucren la formación de enlaces puente de hidrógeno, con grupos -OH del almidón (Jeffrey, 1996) y, estarían, por lo tanto, más retenidos en la matriz de las películas obtenidas con la metodología 3. Según Arvanitoyannis y col. (1998a y b), un menor nivel de organización de las cadenas poliméricas fue alcanzado cuando una más rápida velocidad de gelatinización y/o evaporación fue usada para elaborar películas con almidón de papa hidroxipropilado y gelatina. Bajo estas condiciones, los sorbatos podrían interactuar en mayor medida con las moléculas de almidón a través de enlaces puentes de hidrógeno.

El ácido sórbico puede formar complejos con el almidón, cuyas características dependen del tipo de almidón como así también de la concentración y propiedades

químicas del preservador (Duckova y Mandak, 1981). Los complejos mencionados podrían modificar algunas propiedades de los preservadores tales como su solubilidad, difusividad, coeficiente de partición y la habilidad para penetrar en membranas biológicas, disminuyendo la actividad antimicrobiana (Kurup y col., 1995). Ofman y col. (2004) reportaron que el KS interactúa con el almidón de mandioca afectando su comportamiento sorcional, densidad global, cohesividad y módulo de Young inicial.

Con el objetivo de investigar la interacción entre el KS y el almidón, la cual podría, como se dijo previamente, condicionar la liberación del antimicrobiano, se analizaron por FT-IR películas elaboradas a través del método 2. La zona de interés del espectro obtenido se muestra en la Figura 2.3.

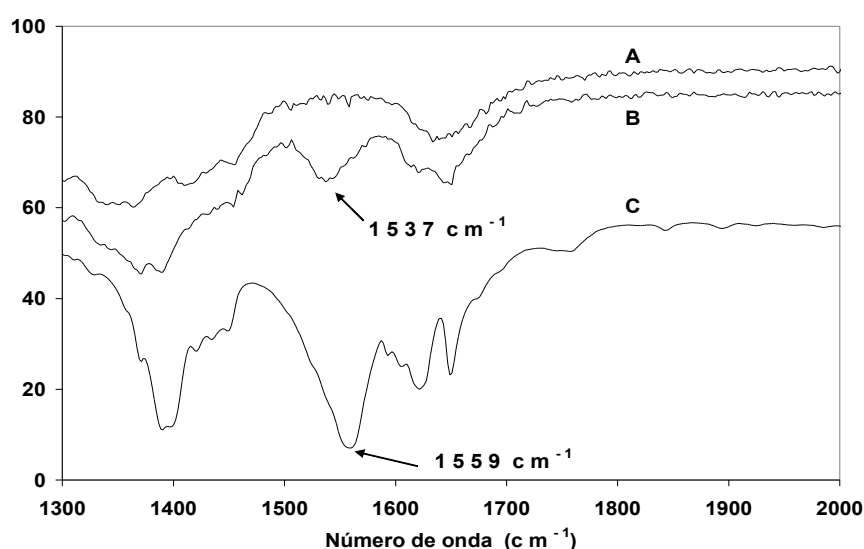


Figura 2.3 Espectro FT-IR de la región 1200 a 2000 cm^{-1} para (A) película de almidón de mandioca; (B) película de almidón de mandioca y KS; (C) KS.

Es un hecho conocido, que la existencia de enlaces de hidrógeno altera las frecuencias de estiramiento y flexión tanto del grupo donador de protón como del grupo aceptor. Como puede observarse en la Figura 2.3, en las películas conteniendo almidón y sorbato de potasio (trazo B) la señal correspondiente al estiramiento asimétrico del grupo -COO^- del KS (trazo C), sufrió un desplazamiento desde 1559 cm^{-1} a 1537 cm^{-1} , el cual estuvo probablemente, determinado por la formación de enlaces puente de hidrógeno entre grupos -OH del almidón y el sorbato. Este grado de reducción en la frecuencia para un grupo aceptor de protón, esta dentro del orden de los desplazamientos comúnmente reportados ($15\text{-}50 \text{ cm}^{-1}$) para las interacciones tipo puente de hidrógeno intermolecular entre compuestos hidroxílicos y compuestos carbonílicos o carboxílicos (Silverstein y col., 1991).

▪ **Análisis del parámetro k**

El análisis estadístico de las constantes de velocidad (k) mostró que la técnica de fabricación y el pH del caldo ejercieron una influencia significativa en la liberación del sorbato (Tabla 2.1). Puede observarse que los valores de k fueron significativamente mayores a pH 4,5 para las películas elaboradas con el método 1 y el método 2.

Luego de la inmersión en el caldo, las películas se hinchan como consecuencia de la difusión de moléculas de agua dentro de la matriz de almidón afectando así, probablemente, el pH original de la misma. Como resultado, una relación diferente entre la forma disociada y no disociada del preservador es alcanzada en cada caso (pK_a KS = 4,75 a 25°C).

A pH 3,0, la forma no disociada prevalece (ácido sórbico), la cual es menos soluble en sistemas acuosos que la forma cargada del sorbato (Sofos, 1989). Sin embargo, los valores de k obtenidos para las películas fabricadas con el método 3 y en el rango de pH entre 3,0 y 6,0, fueron los más altos, en general, y no mostraron diferencias significativas para los distintos pH ensayados. Esta última tendencia podría estar relacionada con el carácter amorfo de este tipo de película el cual podría facilitar el ingreso del agua dentro la matriz de la película, produciendo un incremento en la velocidad de liberación y por lo tanto mayores valores de k (Tabla 2.1).

Chen y col (1996) reportaron, para películas de metilcelulosa-quitosano conteniendo sorbato, que las velocidades de liberación del preservador a pH 3,0 y 6,0 no fueron significativamente diferentes. Asimismo, no fue observado ningún efecto del pH (3,8 - 7,0) de la solución adyacente a las películas, en los valores de la constante de difusión del sorbato soportado en películas de κ -carragenano, según lo informado por Choi y col. (2005). Por el contrario, otros investigadores (Rico-Pena y Torres, 1991) observaron una mayor retención superficial del ácido sórbico contenido en películas elaboradas con metilcelulosa y ácido palmítico, a medida que el pH de la solución receptora de agua-glicerol fue incrementado desde 3,0 hasta 7,0. Las diferentes tendencias mencionadas en relación al efecto del pH de la solución sobre la liberación del preservador, sugieren que el tipo de biopolímero empleado en la fabricación de las películas juega un rol substancial.

Cuando la influencia del método de fabricación sobre la liberación del preservativo fue evaluada a pH 3,0 ó 4,5, se observaron valores más bajos de la constante de liberación, en general, para películas elaboradas a través del método 1 o del método 2. En consecuencia, se concluye que la menor velocidad de secado empleada en estas técnicas, determinó un mayor grado cristalino y / u orden estructural

de la matriz de la película, el cual restringió la interacción matriz-agua resultando una constante de liberación más chica que aquellas observadas para películas elaboradas con el método 3.

De todos modos, la condición amorfa de esta última película debe haber favorecido no solamente la interacción agua - almidón (acelerando la entrada de agua) sino también la interacción antimicrobiano - almidón. Este último efecto parece prevalecer a períodos de tiempo prolongados determinando un menor valor de Q_{inf} para el método 3 comparado con el método 1.

Este ensayo fue también realizado con caldos no inoculados, y se observó que la cinética no fue afectada por la presencia de los microorganismos. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 2.4 para el caso de películas fabricadas con el método 3, y siendo 6,0 el pH del caldo receptor.

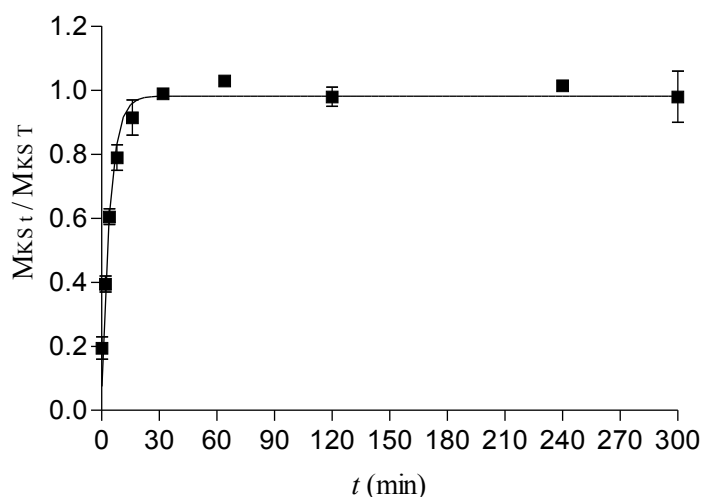


Figura 2.4 Liberación de KS desde películas comestibles elaboradas con el método 3. Caldo sin inocular y pH 6,0. $M_{KS t}$: cantidad de KS liberado a tiempo t ; $M_{KS T}$: cantidad total de KS contenida en la película a tiempo cero.

Los parámetros cinéticos obtenidos en este caso, $Q_{in} = 0,982 \pm 0,021$ y $k = 0,238 \pm 0,019 \text{ min}^{-1}$, no difieren significativamente ($\alpha: 0,05$) de los parámetros correspondientes a la liberación del antimicrobiano desde películas elaboradas con el método 3 en un caldo a pH 6,0 e inoculado, concluyéndose que la presencia de *Z.bailii* no afecta la cinética de liberación del KS.

También puede observarse en la Tabla 2.1 que en el rango 3,0 - 4,5, el pH del caldo no ejerció un efecto significativo ($\alpha: 0,05$) sobre el valor de Q_{inf} , para los tres métodos de fabricación. De todos modos, de acuerdo a lo visto en la Figura 2.2, panel C (método 3), la concentración de antimicrobiano tanto a pH 4,5 como a pH 3,0 sufrió un

retardo en su incremento entre los 10 y 90 minutos y este comportamiento condujo a valores de Q_{inf} más bajos que aquellos obtenidos para pH 6,0.

2.3.1.2 Estudio del mecanismo de liberación del sorbato de potasio a un medio acuoso

En el capítulo 1 quedaron establecidas las diferencias en las propiedades físicas de las películas a base de almidón de mandioca y glicerol, debido a la obtención de las mismas a través de diferentes métodos de fabricación. En el presente apartado, se pretende establecer si dichos métodos también influyen tanto en el mecanismo de absorción de agua como en el de liberación de KS contenido en dichas películas, cuando estas son sumergidas en una solución acuosa. Para mayor claridad, estos aspectos serán discutidos separadamente.

a) Estudio de la absorción de agua

Como será mostrado más adelante, la cantidad de KS liberada en el equilibrio en las dos soluciones acuosas estudiadas, es siempre despreciable cuando se compara con la cantidad de agua absorbida en el equilibrio. La cantidad de polímero disuelto en la solución acuosa externa ha sido considerada también despreciable, teniendo en cuenta los cortos tiempos necesarios para alcanzar las condiciones de equilibrio.

La Figura 2.5 paneles A y B muestra la cinética de absorción de agua de las tres películas estudiadas en caldos Sabouraud con pH ajustado a 3,0 y 4,5 respectivamente. Las curvas mostradas en las figuras mencionadas, fueron obtenidas por ajuste de la ecuación (5) (sección 2.2.2.2) a los datos experimentales. Los resultados del procedimiento de ajuste, como así también los valores de $\bar{E} \%$, están listados en la Tabla 2.2.

Como puede ser inferido a partir de los datos enumerados en dicha tabla y de lo mostrado en la Figura 2.5, el modelo se ajusta satisfactoriamente a los datos experimentales, sugiriendo que, a pesar de su simplicidad, el modelo adoptado puede ser utilizado para obtener información útil acerca de los mecanismos de absorción de agua en matrices poliméricas hidrofílicas.

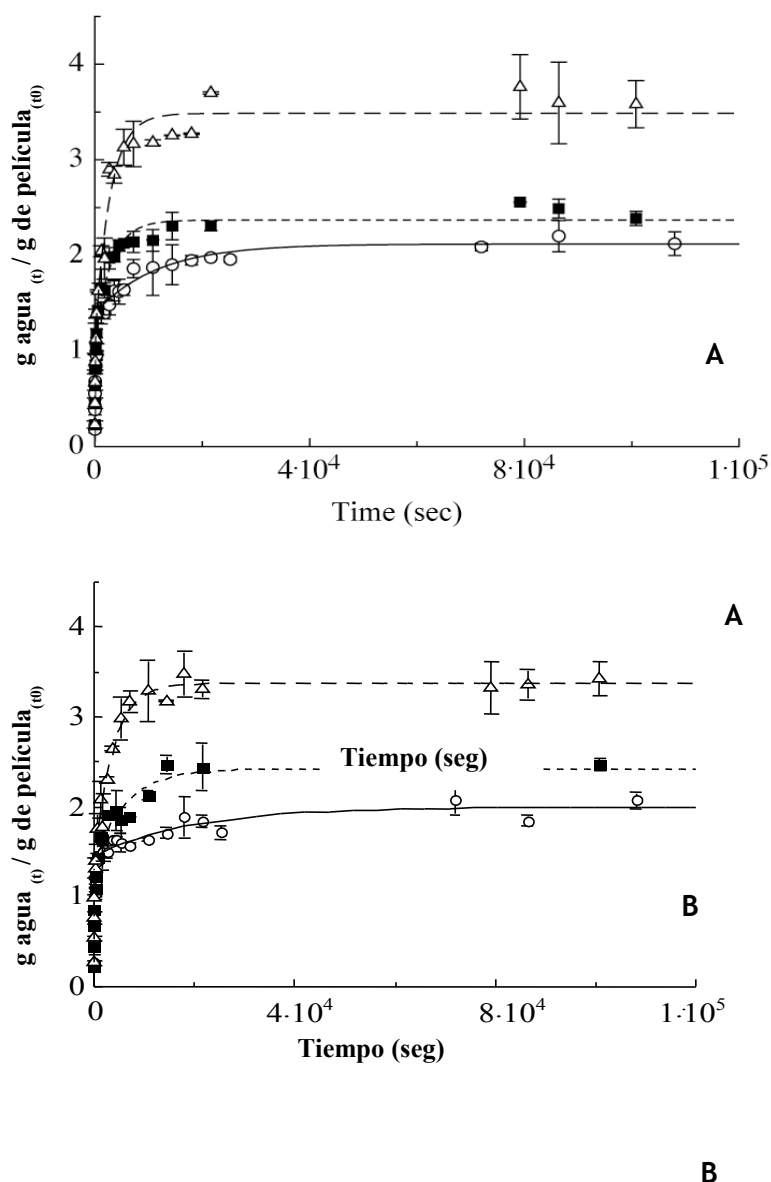


Figure 2.5 Cinética de absorción de agua de películas obtenidas con distintos métodos de fabricación. Panel A: pH 3,0; panel B: pH 4,5. Datos experimentales de películas obtenidas por: (○) método 1; (■) método 2 y (Δ) método 3. Las curvas son el resultado de la ecuación (5) a los datos experimentales.

Como puede ser deducido a partir de los parámetros del modelo, para todas las películas estudiadas y a los dos valores de pH evaluados, la relajación polimérica prevalece frente al movimiento Browniano. Esto es una consecuencia directa de la naturaleza hidrofílica de la matriz investigada. De hecho, debido al notable grado de absorción de agua, las macromoléculas del polímero se ven forzadas a reordenarse en una nueva conformación. Este proceso es el principal responsable para la desviación del comportamiento difusivo Fickiano ideal.

Como se muestra en la Tabla 2.2, el pH de la solución externa influye levemente en la cinética de absorción de agua. En particular, el coeficiente de difusión de agua, X_F y τ , incrementan con el valor de pH. En el caso de $M^{eq.}$, no se observa una tendencia específica.

Por otro lado, el procedimiento de elaboración de las películas afecta acentuadamente las propiedades de transporte del agua. Esto es una consecuencia directa de los diferentes grados de cristalinidad de las películas estudiadas. De hecho, los dominios cristalinos actúan como regiones no perturbables frente a compuestos de bajo peso molecular. Más aún, las zonas cristalinas también actúan como agentes que entrecruzan físicamente a las macromoléculas, previniendo así la excesiva absorción de agua de las mismas.

Tabla 2.2 Parámetros del modelo obtenidos a partir del ajuste de la ecuación (5) a los datos experimentales de absorción de agua (hinchamiento).

Parámetros ^a	Método 1		Método 2		Método 3	
	pH 3,0	pH 4,5	pH 3,0	pH 4,5	pH 3,0	pH 4,5
$D_F^W \times 10^7$	5,28 ± 0,99	9,41 ± 1,95	18,69 ± 4,89	12,60 ± 3,23	21,67 ± 10,29	23,49 ± 6,47
X_F^W	0,658 ± 0,033	0,725 ± 0,036	0,479 ± ,034	0,560 ± 0,036	0,323 ± 0,043	0,380 ± 0,027
τ^W	11503 ± 3152	19317 ± 8007	3051 ± 476	6207 ± 1356	2808 ± 439	3605 ± 431
$M^{eq., W}$	2,12 ± 0,054	1,99 ± 0,074	2,37 ± 0,042	2,42 ± 0,059	3,48 ± 0,070	3,37 ± 0,051
$M^{*eq.}$	2,34	2,20	2,59	2,64	3,72	3,60
$\bar{E} \%$	7,8837	8,2186	4,6012	6,1492	5,4117	4,5061

^a: D_F^W : coeficiente de difusión del agua (cm²/seg); X_F^W : desviación del mecanismo de transporte a partir del comportamiento Fickiano ideal; τ^W : tiempo de relajación asociado a la relajación del polímero (seg⁻¹); $M^{eq., W}$: g de agua en el equilibrio por g de película (g agua_t / g película_{t0}). Los parámetros obtenidos se muestran con su desvío estándar. $M^{*eq.}$: cantidad de agua disuelta dentro de la fase amorfa de la matriz polimérica (g agua_t / g película_{t0}); $\bar{E}\%$: diferencia porcentual relativa.

Como consecuencia, $M^{eq.}$ y el coeficiente de difusión del agua incrementan a medida que el nivel de cristalinidad decrece. Afectando $M^{eq.}$ por la fracción volumétrica de fase amorfa (sección 1.3.2 del Capítulo 1), se obtiene la cantidad de agua disuelta en la fase amorfa de la matriz polimérica ($M^{*eq.}$; Tabla 2.2). También en este caso, el

procedimiento de elaboración de las películas ejerce una mayor influencia en los valores de M^{*eq} que la ejercida por el pH de la solución receptora externa. De hecho, los resultados indicarían que la afinidad entre el agua y la matriz polimérica se incrementa desde la película obtenida por el método 1 a la obtenida por el método 3. Esto es, probablemente, debido al hecho de que el arreglo macromolecular dentro de la matriz polimérica está fuertemente influenciado por el proceso de fabricación, como se indicó en el Capítulo 1. Los valores de X_F y τ , están relacionados con el grado de absorción de agua (M^{*eq}). A medida que M^{*eq} se incrementa, la extensión por la cual la relajación de la matriz afecta la cinética de absorción de agua también incrementa (X_F^w toma valores más bajos). Por el contrario, τ , el cual está relacionado con la movilidad macromolecular, decrece a medida que el grado de absorción de agua aumenta.

b) Estudio de la liberación de sorbato de potasio

A continuación se muestran los datos de la cinética de liberación de sorbato de potasio (KS) desde una matriz polimérica hidratada y relajada (hinchada). Inicialmente, el agente antimicrobiano se encuentra atrapado dentro de la matriz de un polímero altamente hidrofílico (almidón de mandioca). Cuando la película es puesta en contacto con una solución acuosa, las moléculas de agua penetran dentro de la matriz provocando su hinchamiento. A medida que el agua difunde desde la solución externa hacia la matriz, la movilidad molecular de la red polimérica se incrementa cada vez más, permitiendo que el compuesto activo difunda a través de la matriz hacia la solución receptora, hasta que se alcanza el equilibrio termodinámico entre la solución externa y el polímero.

A partir de la descripción anterior del proceso, se infiere que la cinética de liberación del KS depende de los siguientes fenómenos: 1) Difusión del agua; 2) relajación de la matriz macromolecular; 3) Difusión del compuesto activo a través de la red polimérica hinchada (hidratada). El modelo propuesto para describir la cinética de absorción de agua puede también ser usado para describir la cinética de liberación del KS. Por supuesto, debido a los fenómenos involucrados, cuando el modelo propuesto es usado para describir los datos de liberación del antimicrobiano, los parámetros del modelo también dependen de la cinética de hinchamiento.

La Figura 2.6 paneles A y B muestra la cinética de liberación del KS desde los tres tipos de películas obtenidas, a los dos niveles de pH estudiados. Como se indicó más arriba, las curvas mostradas en dichas figuras fueron obtenidas por ajuste de la ecuación (5) a los datos experimentales. Los resultados del procedimiento de ajuste, como así también los valores de $\bar{E} \%$, están listados en la Tabla 2.3.

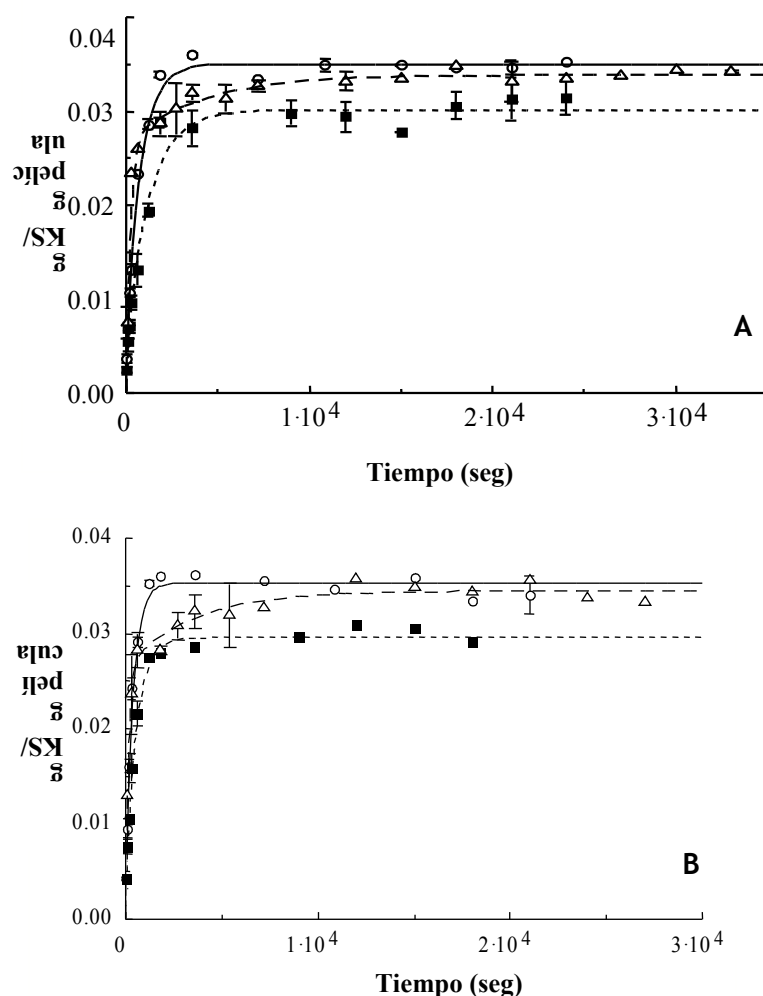


Figura 2.6 Cinética de liberación de KS de películas obtenidas con distintos métodos de fabricación. Panel A: pH 3,0; panel B: pH 4,5. Datos experimentales de películas obtenidas por: (o) método 1; (■) método 2 y (Δ) método 3. Las curvas son el mejor ajuste de la ecuación (5) a los datos experimentales.

Como puede ser visto en la tabla mencionada y como es mostrado en las Figura 2.6, el modelo ajusta satisfactoriamente a los datos experimentales, sugiriendo que a pesar de la complejidad del fenómeno involucrado durante la liberación del compuesto activo a partir de la matriz polimérica, el modelo adoptado puede ser utilizado para obtener información útil acerca del mecanismo de liberación de compuestos de bajo peso molecular desde una matriz polimérica.

Tabla 2.3 Parámetros del modelo obtenidos a partir del ajuste de la ecuación (5) a los datos experimentales de liberación de KS.

Parámetros ^a	Método 1		Método 2		Método 3	
	pH 3,0	pH 4,5	pH 3,0	pH 4,5	pH 3,0	pH 4,5
$D_F^S \times 10^7$	1,41 ± 0,11	2,86 ± 0,29	0,896 ± 0,110	1,99 ± 0,15	4,99 ± 1,07	7,876 ± 1,44
X_F^S	1,00	1,00	1,00	1,00	0,794 ± 0,056	0,768 ± 0,037
τ^S	-	-	-	-	4205 ± 1937	3520 ± 1146
$M^{eq., S}$	0,03500 ± 0,00051	0,03535 ± 0,00061	0,03015 ± 0,00070	0,02956 ± 0,00041	0,03389 ± 0,00043	0,03449 ± 0,00044
$M^{eq., S} / M^{lo.}$	1,019	1,029	0,937	0,919	0,927	0,9436
$\bar{E} \%$	7,8412	9,7968	9,1007	4,8551	3,7633	2,7444

a: D_F^S : coeficiente de difusión del sorbato (cm^2/seg); X_F^S : desviación del mecanismo de transporte a partir del comportamiento Fickiano ideal; τ^S : tiempo de relajación asociado a la relajación del polímero (seg^{-1}); $M^{eq., S}$: g de sorbato liberado en el equilibrio por g de película (g KS/g película). Los parámetros obtenidos se muestran con su desvío estándar. $M^{lo.}$: g de sorbato inicial por g de película; $\bar{E} \%$: diferencia porcentual relativa.

Como una consecuencia directa de la cinética de absorción de agua, también para la cinética de liberación, el pH de la solución receptora influye levemente en la cinética de liberación del KS. En particular, un pequeño incremento en el valor del coeficiente de difusión del KS con el pH fue observado; este efecto podría estar relacionado con el efecto del pH en el equilibrio de disociación del sorbato (Sofos, 1989). En el caso de la relación entre la cantidad de KS liberada en el equilibrio, $M^{eq.}$, y la cantidad de antimicrobiano contenida en la película, $M^{lo.}$, no se observa una tendencia específica con esta variable. En el caso de las películas elaboradas con el método 3, no hay una diferencia estadísticamente significativa en los valores de X_F ni en los de τ con el pH.

Como se discutió previamente para la cinética de hidratación de las películas, en el caso de la cinética de liberación de KS también se observó una importante influencia del método de fabricación empleado. De hecho, los resultados listados en la Tabla 2.3 destacan que la película obtenida con el método 1 y con el método 2 tienen el mismo mecanismo de liberación, Fickiano Ideal, mientras que en el caso de la película fabricada a través del método 3, la relajación de la matriz polimérica prevalece frente al movimiento Browniano. Esto es, probablemente, consecuencia del mecanismo de absorción de agua, el cual está fuertemente controlado por la relajación del polímero en el caso de la película obtenida con el método 3, como también los sugieren los valores de X_F y τ .

La metodología empleada para elaborar las películas, también afecta la cantidad de KS liberada en el equilibrio. M^{eq}/M^0 , indica que el método de fabricación influye en la afinidad entre el polímero y el KS: en el caso de la elaboración con velocidades de gelatinización y secado lentos (método 1) se obtuvieron los valores más altos, mientras que para los métodos 2 y 3 se observó una menor fracción de sorbato liberado.

2.3.1.3 Cinética de liberación del sorbato de potasio a un medio semisólido

Se estudió la cinética de difusión del antimicrobiano, a un medio semisólido, para películas obtenidas a través de los 3 métodos de fabricación (Figura 2.7). Se puede observar que la difusión se incrementó con el tiempo hasta que se alcanzó un valor asintótico luego de 2-3 horas de almacenamiento.

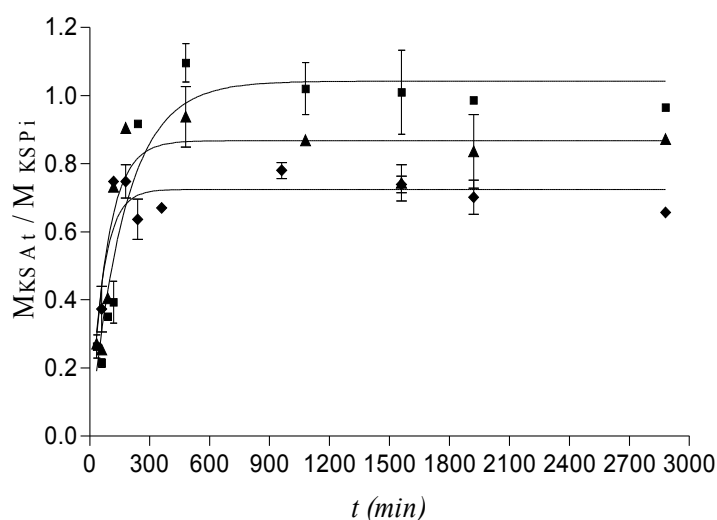


Figura 2.7: Liberación de KS desde películas comestibles a un medio semisólido

■ método 1 (M1); ▲ método 2 (M2); ◆ método 3 (M3)

$M_{KS A t}$: cantidad de sorbato de potasio liberado al agar al tiempo t ; $M_{KS P i}$: cantidad total de sorbato de potasio contenida en la película a tiempo cero.

— Modelo cinético de pseudo primer orden.

Los datos experimentales ajustaron a una cinética de primer orden y en la Tabla 2.2 pueden apreciarse los parámetros cinéticos obtenidos. Se observó que las constantes cinéticas de liberación (métodos 1, 2 y 3) y los valores asintóticos correspondientes a los métodos 2 y 3, fueron más bajos que aquellos obtenidos para el medio líquido.

Estos resultados están en concordancia con las tendencias reportadas por Guilbert y col. (1986), quienes comprobaron que la difusión del ácido sórbico se encontraba restringida por la presencia de una estructura tipo gel.

Tabla 2.4 Efecto de la técnica de gelatinización / secado empleada para elaborar películas comestibles, sobre los parámetros cinéticos de la liberación de KS a un medio semisólido de pH 4,5 y a_w 0,98

Método de fabricación ⁱ	[KS] en el equilibrio (g/kg)	Q_{inf} ⁱⁱ	k (min ⁻¹) ⁱⁱ	R^2
Método 1	0,1162 ± 0,0034	1,042 ± 0,044	0,0058 ± 0,0008	0,9081
Método 2	0,1081 ± 0,0048	0,868 ± 0,043	0,0117 ± 0,0024 ^a	0,7478
Método 3	0,1028 ± 0,0035	0,724 ± 0,026	0,0155 ± 0,0031 ^a	0,6582

ⁱ Concentración de KS inicial en las películas: método 1, 31,34 g/kg; método 2, 31,89g/Kg; método 3, 35,82g/kg.

ⁱⁱ Se informa el mejor valor ajustado y su error estándar. Valores seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (α : 0,05).

R^2 : bondad del ajuste (Statgraphics, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland).

Q_{inf} : cociente entre $M_{KS inf}$ y $M_{KS P i}$. $M_{KS inf}$ es la cantidad de sorbato de potasio liberada en el equilibrio y $M_{KS P i}$ es la cantidad de sorbato de potasio contenida en la película a tiempo cero.

k : constante cinética de primer orden.

Es de destacar que la a_w del agar utilizado fue mayor que la a_w de las películas (0,980 vs 0,576), por lo que se observó el hinchamiento de las mismas y, paralelamente, un incremento en el diámetro de los discos desde su valor inicial de 1,0 cm hasta un valor de, aproximadamente, 1,3 cm al final de la experiencia, debido a la sorción de agua por parte de la matriz amilácea. Este incremento corresponde a un aumento de diámetro del 30%. En el estudio de liberación en un medio líquido, el incremento registrado en el diámetro de las películas fue de, aproximadamente, 50%; por lo tanto, las películas en contacto con el agar han sufrido un menor hinchamiento y, por lo tanto, probablemente una menor relajación molecular.

En el caso de las películas elaboradas con el método 1, el valor de Q_{inf} fue del mismo orden que el obtenido en el ensayo de liberación a un medio líquido. Esto se debería, en este caso, a la menor interacción del sorbato con el almidón, hecho que se correspondería con la mayor característica cristalina de las mismas.

También puede apreciarse que el valor asintótico para las películas fabricadas por el método 3 es significativamente menor que el obtenido para el método 2, y este último, menor que el correspondiente al método 1. Del mismo modo que en el medio líquido, el carácter amorfo de la película elaborada a través del método 3, provocaría una mayor retención del preservador.

En cuanto al valor de la constante de velocidad, sólo se observaron diferencias significativas en el caso de la película elaborada con el método 1, el cual fue un orden menor comparado con los valores de k para las otras dos metodologías. Posiblemente, el

agua ingresó a menor velocidad en la matriz amilácea como resultado de la mayor fracción cristalina observada en este tipo de películas, provocando ello una marcada disminución en la velocidad de liberación del sorbato.

2.3.2 Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio soportado en películas comestibles

2.3.2.1 Efectividad del preservador liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano

La Figura 2.8 muestra la capacidad para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, que presenta un caldo conteniendo sorbato de potasio (KS) liberado por películas fabricadas con almidón de mandioca. A fines comparativos, se incluye en las mismas figuras, la información sobre la acción antimicrobiana que presenta una cantidad de preservador equivalente a la hallada en condiciones de equilibrio de liberación, cuando dicha cantidad es agregada al comienzo del período de incubación (agregado directo).

Los resultados obtenidos, en caldos a pH 4,5 y 3,0, con películas fabricadas con los métodos 1 y 2, fueron similares a los obtenidos con el método 3. Por lo tanto se infiere que los distintos métodos de fabricación no ejercieron, en general, ningún efecto diferencial en la actividad antimicrobiana del sorbato. En la Figura 2.8 se observan, a modo de ejemplo, las curvas y los ajustes obtenidos con las películas elaboradas con el método 3.

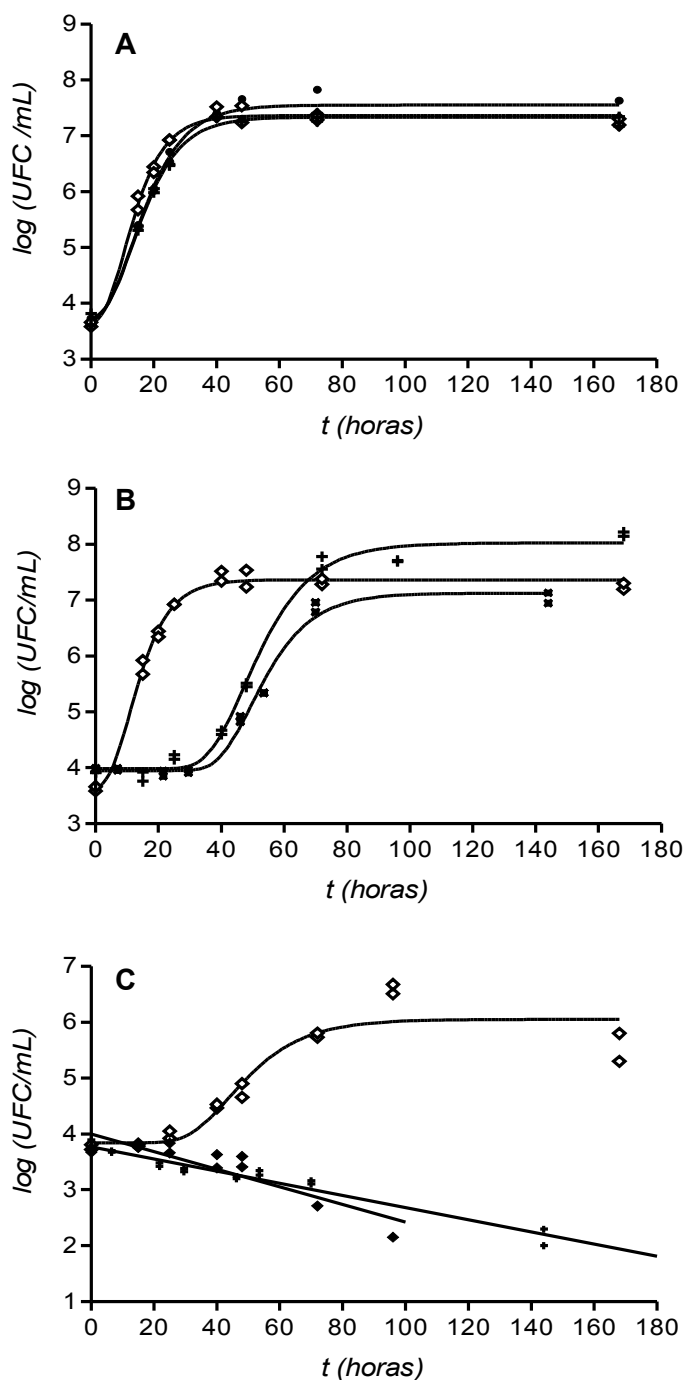


Figura 2.8 Crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud ajustado a diferentes valores de pH. UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL. Panel A: pH 6,0; panel B: pH 4,5; panel C: pH 3,0. ◆ caldo con películas portadoras de KS; □ caldo conteniendo películas sin KS; + caldo con agregado directo de la cantidad de KS liberada desde la película en condiciones de equilibrio. — Ajuste de la ecuación de Gompertz o ajuste lineal.

También, en la Figura 2.8 se muestran los ajustes de los puntos experimentales de crecimiento de la levadura con la ecuación de Gompertz y el ajuste lineal en el caso, de registrarse muerte del microorganismo (panel C).

En la Figura 2.9, se resumen los parámetros de ajuste obtenidos para todos los sistemas estudiados: velocidad de crecimiento específica (μ), tiempo lag y la máxima población de células alcanzada al final de la incubación.

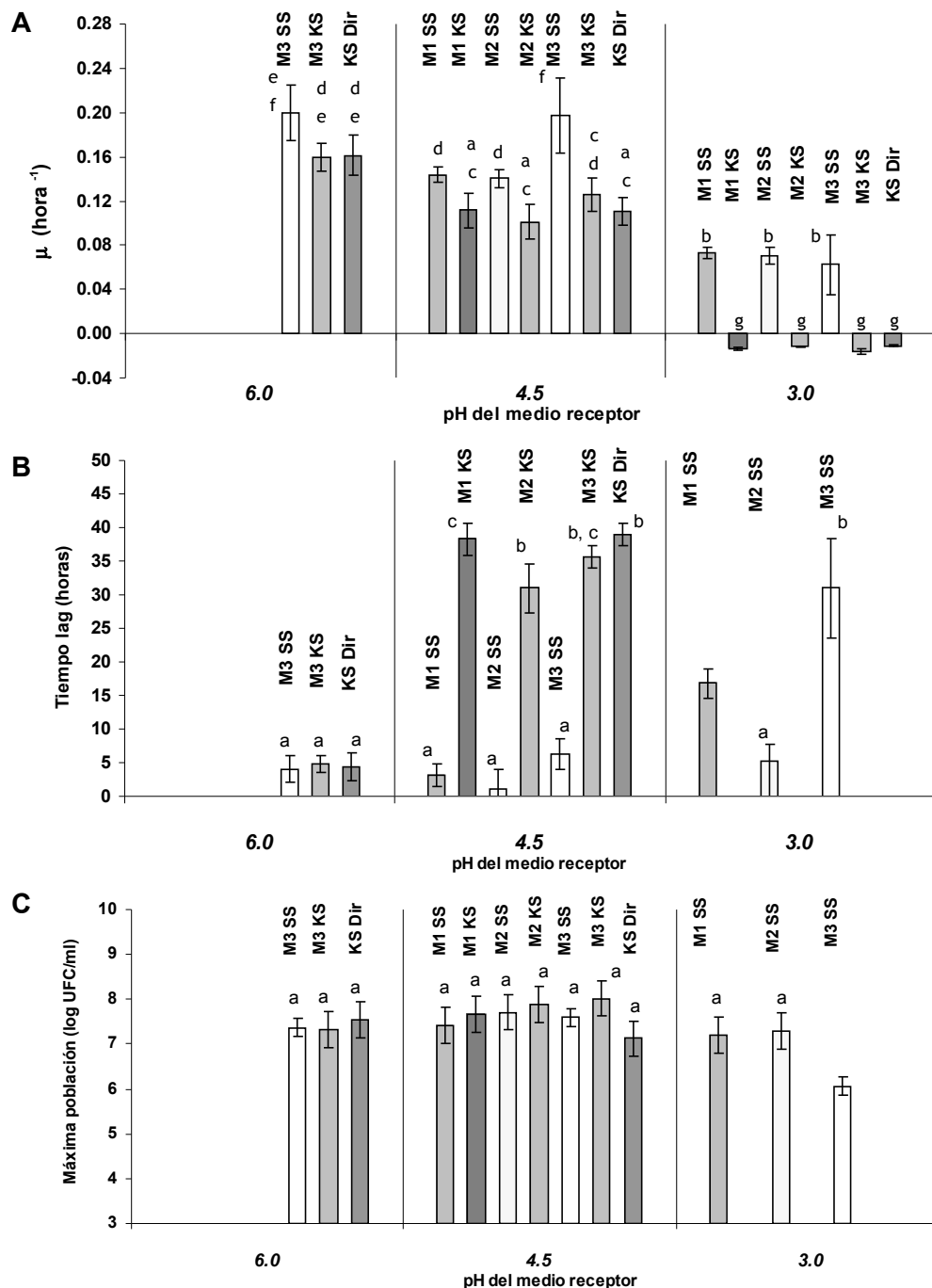


Figura 2.9 Parámetros de crecimiento obtenidos con la ecuación de Gompertz y ajuste lineal de las curvas de crecimiento de *Z. bailii* en caldos Sabouraud a distintos pHs y conteniendo películas comestibles.

Panel A: μ , velocidad de crecimiento específica; Panel B: tiempo lag; Panel C: máxima población de células. Los parámetros se informan con su error estándar.

Como puede observarse en la Figura 2.8, cuando el pH del caldo receptor fue 6,0, el sorbato liberado desde la película o su adición directa al medio de cultivo no afectó el crecimiento de la levadura, permitiendo su desarrollo sin ejercer inhibición. En el panel A de la misma figura se observa que la fase estacionaria se alcanzó, aproximadamente, luego de las 48 horas de incubación. La falta de acción inhibitoria a este pH, es, probablemente, debida a la presencia del preservador en su forma disociada, siendo la forma no disociada la que principalmente posee actividad antimicrobiana (Sofos, 1989; Pethybridge y col. 1983; Eklund, 1983).

En la Figura 2.9, panel B, puede apreciarse que cuando el pH del caldo receptor fue 4,5 y, en presencia del KS liberado a partir de las películas, la fase lag de crecimiento de la levadura se extendió entre 30 y 38 horas, luego de las cuales el incremento de la población tuvo lugar a una velocidad menor a la observada para el sistema control (caldo conteniendo película sin preservador), tal como se observa en la Figura 2.9 panel A. Sin embargo, el nivel de población en la fase estacionaria fue similar para ambos sistemas control y tratamiento y para todos los métodos de fabricación (Figura 2.9, panel C). Este comportamiento está relacionado con el hecho de que para un valor de pH de 4,5, en condiciones de equilibrio, el KS presente en el medio alcanzó valores entre 0,418 y 0,464 g/L para los diferentes métodos de fabricación, estando esta cantidad, probablemente, por debajo de la mínima concentración inhibitoria (MCI) a este pH (Pethybridge y col. 1983; Eklund, 1983). Es de destacar que la MCI para *Z.bailii* a pH 5,0 es 1,005 g/L de acuerdo a Praphailong y col. (1997) y, que Castro y col. (2002) establecieron que a pH 3,5 y, en un caldo Sabouraud acidificado con ácido cítrico, la MCI para este microorganismo es 0,400 g/L.

La adición directa de KS al caldo mostró el mismo efecto sobre el crecimiento de los microorganismos, que aquél ejercido por el sorbato liberado desde las películas. Vemos así que el sorbato liberado al medio a partir de las películas o agregado directamente al inicio de la incubación, extendió la fase lag, disminuyó la velocidad de crecimiento de las levaduras y tuvo efecto similar en cuanto al nivel poblacional de la fase estacionaria.

Cuando el pH del caldo receptor fue 3,0, el sorbato liberado desde la película o directamente adicionado al medio, determinó la muerte del microorganismo (Figuras 2.8 panel C). En este caso, la población decreció alcanzando una reducción de 2 ciclos logarítmicos después de 96 horas. Este resultado se explica porque la cantidad de KS liberado desde la película, en la condición de equilibrio, estuvo entre 0,387 y 0,481 g/L para los diferentes métodos de fabricación y, que a pH 3,0, la MCI para inhibir el crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud es 0,300 g/L de acuerdo a Gliemmo y col.

(2004). En la Figura 2.9 panel A se observa que las velocidades de crecimiento del microorganismo, son negativas, para los sistemas en contacto con películas portadoras de KS y elaboradas con cualquiera de los métodos ensayados.

En el caso de las películas libres del preservador e inmersas en caldo con pH ajustado a 4,5 o 6,0, se observó que el patrón de crecimiento de la levadura no fue modificado, sugiriendo que la depresión del pH no ejerció *per se* un efecto inhibitorio en el crecimiento en este rango de pH (Figura 2.8, paneles A y B; Figura 2.9) y ratificando, al mismo tiempo, que la presencia de KS en el caldo es la responsable del efecto antimicrobiano observado a pH 4,5. Pero cuando el pH de la solución receptora fue deprimido a 3,0, la fase lag de desarrollo de las levaduras fue incrementada y la velocidad de crecimiento fue reducida, en general, respecto de los pHs 4,5 y 6,0. Este comportamiento corrobora que la depresión del pH a 3,0 ejerció *per se* un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del microorganismo, tal como fue reportado previamente por otros investigadores (Praphailong y col., 1997; Stiles y col., 2002).

Se destaca que la concentración de KS en el caldo, luego de alcanzado el equilibrio, permaneció constante durante el período de incubación, demostrando que el preservador no fue utilizado por las células de levadura ni fue degradado a través de un mecanismo oxidativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos para los sistemas conteniendo KS, se concluye que la efectividad del preservador no depende de su forma de adición, probablemente debido a su alta velocidad de liberación desde las películas (Tabla 2.1).

Según Chung y col. (2001) la lenta liberación de propilparabeno no es tan efectiva como la adición directa del antimicrobiano cuando la concentración inicial de *S. cerevisiae* es relativamente alta. Sin embargo, la mayor ventaja de una liberación prolongada sobre una adición directa, sería la continua inhibición microbiana si una lenta provisión hacia el alimento ocurre durante un período prolongado de tiempo, hecho que puede ayudar a reducir la contaminación cruzada durante el uso y almacenamiento del alimento.

En nuestro caso, se observó una alta liberación inicial del preservador cuando los ensayos fueron llevados a cabo sin la restricción generada por una matriz semisólida, generalmente presente en productos alimenticios. Esta alta liberación inicial podría inhibir el crecimiento microbiano en el estadio temprano de almacenamiento. Sin embargo, esto podría también resultar en un incremento de la concentración del antimicrobiano en la superficie del alimento y, por lo tanto, provocar un aumento en su velocidad de difusión hacia el interior del mismo debido a la generación de un elevado gradiente de concentración.

2.3.2.2 Efectividad del sorbato de potasio soportado en las películas como barrera a la contaminación por levaduras

La Figura 2.10 (panel A) muestra el efecto inhibitorio del KS incorporado en las películas elaboradas con almidón de mandioca obtenidas con el método 3, sobre el desarrollo de *Z.bailii* inoculada en la superficie de discos de película.

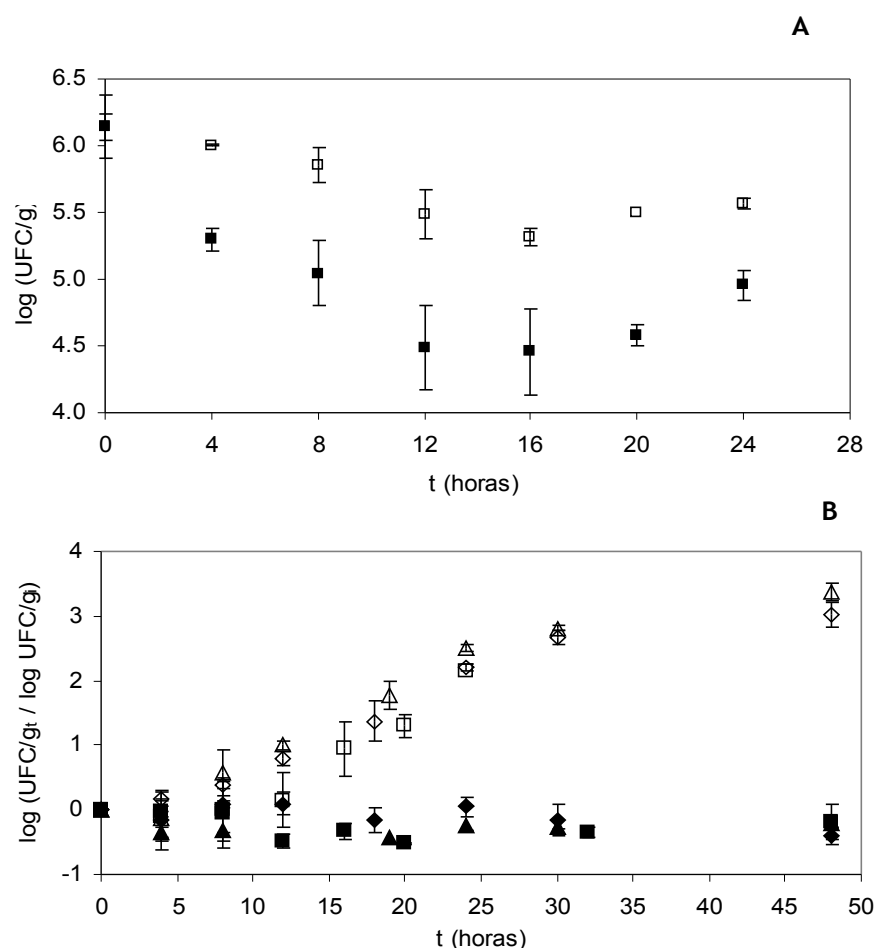


Figura 2.10 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa de *Z.bailii*. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t. UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Panel A: Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película. Panel B: Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0.98 y pH 4,5. ▲ método 1 (M1) película con KS; ◆ método 2 (M2) película con KS; ■ método 3 (M3) película con KS; Δ M1 película sin KS; □ M2 película sin KS, □ M3 película sin KS. Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

Las películas conteniendo KS provocaron una disminución en la población de la levadura que fue un ciclo logarítmico mayor que aquella determinada por las películas libres del preservador, luego de 24 horas de incubación. Este ensayo demuestra que los

sorbatos soportados en las películas están disponibles para actuar como barrera a la contaminación externa de levaduras.

Por otro lado, cuando las películas soporte de KS estuvieron en contacto con un producto de alta actividad de agua y acidificado (agar Sabouraud con a_w deprimido a 0,98 por adición de glucosa y pH ajustado a 4,5 con ácido cítrico (Figura 2.10, panel B), se observó un efecto bacteriostático ya que la población de *Z.bailii* permaneció constante a lo largo del ensayo. Sin embargo, el alimento modelo cubierto con película libre de preservador sufrió un incremento de 3 ciclos logarítmicos en el recuento de la levadura luego de 48 horas de almacenamiento. No se observaron diferencias debido a las técnicas de fabricación ensayadas. De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que las películas conteniendo KS constituyen una efectiva barrera antimicrobiana contra la contaminación externa de levaduras en un alimento ácido y de alta a_w .

2.3.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la metodología empleada en la elaboración de películas tuvo un efecto significativo sobre la cinética y mecanismo de liberación del KS contenido en ellas, destacándose los siguientes hechos:

- Para la liberación de sorbatos a un medio líquido
 - ✓ Los sorbatos soportados en la matriz amilácea de las películas son liberados rápidamente a un medio acuoso ya que, para todas las técnicas de fabricación ensayadas, el antimicrobiano difunde casi completamente luego de 30 minutos de inmersión. Este comportamiento sería consecuencia de la característica altamente hidrofílica del almidón.
 - ✓ La liberación a un medio de pH 3,0 - 6,0, del KS contenido en películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca - glicerol, respondió a un modelo cinético de primer orden. La técnica de fabricación de las películas no influye en el orden de la cinética de la liberación del antimicrobiano pero si afecta las características de dicha cinética.
 - ✓ La constante de velocidad (k) fue afectada por la técnica de gelatinización / secado aplicada: alta velocidad de gelatinización y secado de las películas (método 3) determinó una liberación más rápida del preservador hasta condiciones de equilibrio. Este hecho puede ser una consecuencia de la mayor proporción de fase amorfa en la matriz de almidón.

- ✓ El pH del medio líquido afectó, en general, el valor de k ya que un mayor pH determinó un aumento significativo de k probablemente debido al incremento de la solubilidad del sorbato de potasio con el pH en sistemas acuosos.
- ✓ Gelatinización y secado lentos (método 1) determinaron los valores más altos del parámetro Q_{inf} (fracción del preservador liberado), hecho que estaría determinado por el incremento del grado cristalino.
- ✓ El modelo propuesto para el mecanismo de liberación del sorbato a un medio acuoso, el cual tiene en cuenta la absorción del agua, la relajación de la matriz macromolecular y la difusión del sorbato de potasio a través de dicha matriz, ajusta satisfactoriamente los datos experimentales y, por lo tanto, puede ser aplicado al estudio de la liberación de compuestos de bajo peso molecular desde una matriz polimérica altamente hidrofílica.
- ✓ De acuerdo a dicho modelo, la absorción de agua estaría gobernada principalmente por el fenómeno de relajación polimérica, como consecuencia directa de la naturaleza hidrofílica del almidón.
- ✓ El grado cristalinidad de las películas, el cual depende del método de fabricación utilizado, tiene un importante efecto en las propiedades de transporte del agua. Las zonas cristalinas previenen la absorción de agua y, consecuentemente, la cantidad incorporada en condiciones de equilibrio.
- ✓ Las películas con alta proporción de fase amorfa (método 3), determinan la mayor contribución de la relajación de la matriz a la liberación del antimicrobiano. Esta tendencia puede ser atribuida a un efecto incrementado de la relajación polimérica en la cinética de absorción de agua involucrada.
- ✓ A medida que la proporción cristalina de las películas aumenta, la contribución del movimiento Browniano al mecanismo de liberación del sorbato, se vuelve más importante. Como se mencionó previamente, esto sería consecuencia del menor aporte de la relajación de la matriz en el mecanismo de absorción de agua.
- ✓ La técnica de fabricación de las películas influye en la difusividad del KS, la cual aumenta levemente con el valor de pH del medio receptor. Este resultado podría estar relacionado con el efecto del pH en el equilibrio de disociación del sorbato.

- Para la liberación de sorbatos a un medio semisólido ácido de alta actividad de agua
 - ✓ En general, la velocidad de liberación y el valor asintótico obtenidos en un medio semisólido fueron más bajos que aquellos observados para el medio líquido, debido a la restricción a la movilidad que impone una estructura tipo gel.
 - ✓ Las películas obtenidas con un mayor grado de cristalinidad presentan una mayor difusión del preservador (Q_{inf}), como consecuencia de la reducción de interacciones tipo puente de hidrógeno entre la matriz amilácea y el KS.
 - ✓ La velocidad (k) a la cual el KS es liberado al medio semisólido depende de la metodología empleada en la elaboración de las películas: cuanto mayor es la fracción amorfa, mayor es la velocidad de liberación del antimicrobiano.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de las películas comestibles soporte de KS para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, las conclusiones relevantes son:

- ✓ La efectividad antimicrobiana de los sorbatos liberados al medio líquido no fue afectada por el método de fabricación empleado en la elaboración de las películas como tampoco por el modo de adición:
 - a pH 4,5, el agregado directo del preservador fue tan efectivo en retardar el crecimiento de las levaduras como el sorbato liberado desde las películas.
 - a pH 3,0, el preservador contenido en las películas y liberado al medio o adicionado desde el tiempo cero, decrecieron la población de levaduras logrando una reducción de 2 ciclos logarítmicos luego de 96 horas.
- ✓ En relación a la efectividad de la película como barrera a la contaminación, fue observado que el preservador está disponible para prevenir una contaminación externa y también para controlar el crecimiento de la levadura en un producto semisólido acidificado (pH 4,5) y de alta actividad de agua (a_w 0,98).

Como conclusión final, se desea destacar que las películas estudiadas presentan potencial aplicación como factor de estrés para la inhibición del crecimiento microbiano por constituir un medio adecuado para la provisión de agentes preservadores, ya sea a través de la liberación de los mismos al alimento en contacto, y/o por actuar como

barrera a la contaminación externa de dichos alimentos. Por lo tanto, el desarrollo de películas comestibles aplicables a la preservación de estos alimentos, ofrece una posibilidad sumamente conveniente para el sector industrial, debido a las mejoras en la rentabilidad que acompañarían a la producción de alimentos recubiertos de mayor vida útil.

CAPÍTULO 3

MODIFICACIONES EN LA FORMULACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES

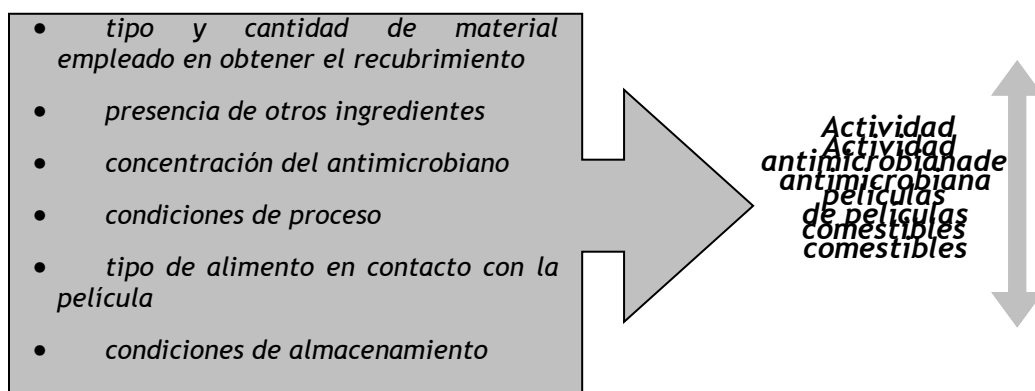
SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SORBATO DE POTASIO Y EN ALGUNAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Factores que afectan la actividad antimicrobiana de los preservadores soportados en películas comestibles

La calidad microbiológica de los alimentos recubiertos con películas comestibles portadoras de antimicrobianos dependerá, en gran medida, de las propiedades de transporte del agente preservador y de su relación con el objetivo perseguido. La movilidad del antimicrobiano dentro de la matriz soporte y hacia el interior del alimento condiciona los niveles del antimicrobiano en la superficie del alimento, afectando su disponibilidad para inhibir la contaminación externa. Asimismo, tendrán suma importancia las interacciones que sufra el antimicrobiano con otros componentes de las películas y/o del alimento con el cual está en contacto.

Entre los factores que influyen en la movilidad e interacción de los preservadores, así como en su efectividad, se pueden mencionar los siguientes:



3.1.1.1 Tipo y cantidad de material empleado en obtener el recubrimiento

Comúnmente se emplean hidrocoloides o lípidos como material base para la elaboración de las películas comestibles. Existe en bibliografía amplia evidencia de la influencia del tipo y cantidad de estos compuestos en la efectividad de los preservadores. Guilbert (1988) informó que la cera carnauba conteniendo ácido sórbico, resultó más eficiente en disminuir el riesgo de contaminación por hongos y levaduras, que los recubrimientos a base de caseína conteniendo niveles similares de ácido sórbico, cuando estos recubrimientos se emplearon para cubrir cubos de papaya y damascos de a_w entre 0,70 y 0,90. Zactiti y Kieckbusch (2005) encontraron que el grado de entrecruzamiento del alginato de sodio con diferentes concentraciones de Ca^{2+} ,

disminuyó la constante de permeabilidad del sorbato de potasio en películas elaboradas con este hidrocoloide. Asimismo, Ripoche y col. (2005) describieron la disminución de la difusividad de la nisina en geles de agarosa con el aumento del contenido de dicho hidrocoloide. Buonocore y col. (2003) reportaron que la cinética de liberación de un agente antimicrobiano, puede ser controlada mediante la modificación del grado de entrecruzamiento de la matriz polimérica que lo soporta y esto, tendría vinculación directa con su biodisponibilidad en sistemas alimenticios. Dawson y col., (2003) reportaron que la nisina incorporada a películas elaboradas a base de proteína de maíz era retenida en un mayor porcentaje que cuando las películas habían sido elaboradas con proteína de trigo. Guilbert, (1988) observó que la retención de ácido sórbico fue un 30% menor en películas de caseína que en películas de gelatina, cuando dichas películas estaban en contacto con sistemas modelo de a_w 0,95.

3.1.1.2 Presencia de otros ingredientes

La disponibilidad de los preservadores puede estar condicionada por la presencia de plastificantes, antioxidantes, lípidos, surfactantes, etc. presentes en la formulación de las películas. Vojdani y Torres (1990), informaron que la difusividad del ácido sórbico/sorbato fue dependiente del tipo de material empleado para la elaboración de la película y que la adición de ácidos grasos redujo dicha difusividad. Contrariamente, el agente empleado para disminuir la actividad de agua (glicerol o cloruro de sodio) no tuvo efecto en la difusividad del ácido sórbico (Giannakopoulou y Guilbert, 1986) y la incorporación de grasas a geles de agarosa, no modificaron la difusividad de la nisina, de acuerdo a lo reportado por Ripoche y col. (2005). Por otra parte, Devlieghere y col., (2004) observaron que la actividad antimicrobiana de coberturas de quitosano, fue negativamente afectada por la incorporación de almidón, proteínas del suero láctico y NaCl a la formulación, mientras que el agregado de aceite no tuvo influencia.

3.1.1.3 Concentración del antimicrobiano

Conocer el nivel de sustancia activa capaz de garantizar la aceptabilidad microbiológica de un alimento, es de suma importancia a la hora de definir la formulación de los recubrimientos. Pranoto y col. (2004) elaboraron películas comestibles con alginato, adicionándolas con aceite esencial de ajo como agente antimicrobiano, y observaron propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* cuando la concentración del aceite superaba el 0,2% y 0,1%

respectivamente. Concentraciones menores no mostraron efecto inhibitorio contra los microorganismos mencionados. Por otro lado, Park y col., (2004), reportaron que la liberación de lisozima se incrementó proporcionalmente con el aumento de la concentración inicial de biopreservador en películas elaboradas con quitosano (0%, 20%, 60% y 100% g lisozima / g quitosano). Sin embargo, la mayor eficacia contra *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*, fueron logradas con una incorporación de lisozima del 60%.

3.1.1.4 Condiciones de proceso

La metodología empleada en la elaboración de las películas, como la técnica de cobertura del alimento afecta la biodisponibilidad de los preservadores. Dawson y col. (2003), estudiaron el efecto del método de elaboración (casting o prensado en caliente) de películas a base de proteína de trigo y maíz, sobre la retención de nisina biológicamente activa (Nisaplin) y de la liberación de la nisina activa a un medio líquido. Los resultados mostraron que, para ambas proteínas, el método de obtención afectó el porcentaje de retención y, que el máximo nivel de nisina activa en medio líquido, fue encontrado en el caso de películas elaboradas por casteo a partir de proteínas de trigo y no por prensado en caliente. Del mismo modo, Cha y col. (2003) determinaron que películas a base de diferentes hidrocoloides y adicionadas con nisina, exhibieron mayores zonas de inhibición frente a *Micrococcus luteus* cuando se fabricaban a través de la técnica de casteo comparadas con las obtenidas por prensado en caliente.

3.1.1.5 Tipo de alimento en contacto con la película

La efectividad del agente antimicrobiano dependerá de las características del alimento en contacto con la película (pH, a_w , composición, solutos, matriz, etc.). Por ejemplo, el coeficiente de partición (relación entre las concentraciones de equilibrio del preservador en el alimento y la película) de los agentes antimicrobianos ácido débiles, puede ser afectado por naturaleza del alimento adyacente. Chung y col. (2001), determinaron valores de dicha constante entre 0,00172 e infinito en los ensayos de liberación de propilparabeno desde una cobertura polimérica en contacto con soluciones acuosas, mezclas de agua y etanol o n-heptano. Los autores atribuyeron estas diferencias a los cambios de solubilidad de la sustancia activa en esas soluciones y a las interacciones entre los solventes y la matriz polimérica. Por otro lado, se observó una leve disminución en los valores de difusividad del ácido sórbico hacia el medio

líquido cuando se incrementaba la concentración del agar (1,5 a 4% p/p) constitutivo de modelos de alimentos, siguiendo una relación lineal (Giannakopoulos y Guilbert, 1986).

Una vez que el proceso de transporte del preservador entre película y alimento, se ha iniciado, la acción antimicrobiana dentro del alimento, estará sujeta a distintos factores como a_w , pH, presencia de solutos, carga microbiana, condiciones de almacenamiento, etc., del producto recubierto en cuestión. Se puede mencionar, ilustrativamente, que el medio ácido incrementa la acción antimicrobiana del sorbato en pavo y, en cambio, no ejerce ningún efecto en salchichas de pollo (Huhtanen y Feinberg, 1980). En el caso particular del KS, éste y otros factores fueron detallados en la sección 1.1.1.3.2. Mientras tanto, el antimicrobiano remanente en la cobertura ejercerá, en mayor o menor medida, su acción de barrera antimicrobiana en superficie. La calidad microbiológica global del alimento, dependerá entonces de ambas acciones.

3.1.1.6 Condiciones de almacenamiento

Numerosos estudios han demostrado que antimicrobianos, como los sorbatos, inhiben a los microorganismos más efectivamente a bajas temperaturas de almacenamiento que a altas (Pederson y col., 1961). Giannakopoulos y Guilbert (1986) reportaron que, a medida que la temperatura decrecía (40 a 5°C), había una marcada disminución de la difusividad aparente del ácido sórbico hacia geles de agar-agar a partir de la superficie.

Teniendo en cuenta lo antedicho, se hace evidente la dificultad de predecir el aporte de cada uno de estos factores en la acción inhibitoria de los preservadores. La complejidad de las interacciones con los componentes de las películas y las características particulares de migración de los antimicrobianos en cada sistema alimenticio, hacen difícil estimar su efectividad, observándose casos de sinergismo, antagonismo o de aditividad.

Cabe mencionar, que también debe considerarse la influencia de las propiedades de adhesión y de la metodología de aplicación de las películas en su funcionalidad. Franssen y col. (2003) informaron que la forma más efectiva para el recubrimiento de nueces era la generación de la cobertura por vertido, mientras que para el queso era mejor la inmersión o el pincelado.

En el presente capítulo se estudiará el efecto de algunos de los factores mencionados anteriormente en el comportamiento del KS soportado en las películas estudiadas. A continuación se profundizará en los antecedentes bibliográficos relacionados, a fin de ampliar los conceptos enunciados.

3.1.2 Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio

3.1.2.1 Influencia del pH de las películas

A medida que el pH del sistema disminuye, aumenta la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos débiles, ya que su efectividad depende directamente de la concentración de la forma no disociada del ácido.

Se ha reportado que los ácidos cítrico y láctico incrementan la actividad antimicrobiana de los sorbatos en mayor grado que los ácidos inorgánicos (Restaino y col., 1982; Smittle y Flowers, 1982). Por lo tanto, la naturaleza del ácido utilizado en deprimir el pH tiene influencia en la capacidad antimicrobiana de las películas.

Los sorbatos, como todo ácido débil, ven disminuida su solubilidad en medio ácido, pero incrementan su capacidad antimicrobiana al aumentar la fracción de ácido no disociado (Sofos y Busta, 1983).

A diferencia de otros preservadores ácido débiles (propionato y benzoato), los sorbatos aún son efectivos en el rango de pH comprendido entre 6,0 - 6,5. (Sofos y Busta, 1981). Varios autores (Praphailong y col., 1997; Seward y col., 1982; Smoot y Pierson, 1981), reportaron que el sorbato de potasio deja de ser eficaz a valores de pH mayores a 7,0. A pH 7,00 el porcentaje de ácido sórbico no disociado es 0,6%, mientras que a pH 3,00 es del 98% (Sofos y Busta, 1981). Se infiere entonces, que para poder predecir la efectividad del sorbato en un producto particular, es necesario en principio conocer el valor de pH, la solubilidad y la constante de disociación en dicho producto.

La menor solubilidad del sorbato de potasio a medida que el pH desciende, determina la disminución de la cantidad de sorbato que se puede incorporar a las películas de pH deprimido. Pero, por otro lado, aumenta la fracción de sorbato no disociada, y por lo tanto con capacidad antimicrobiana efectiva, en las películas de menor pH.

3.1.2.2 Efecto de la concentración de sorbato de potasio

Ozdemir y Floros (2001) encontraron que las propiedades de transferencia del KS incorporado a películas elaboradas con proteína del suero láctico, dependían de la concentración del antimicrobiano. A medida que aumentaba la cantidad de sorbato, el coeficiente de difusión del preservador también se incrementaba. Estas observaciones tienen directa influencia en el uso de este tipo de películas como sistemas de liberación de sustancia activa sobre la superficie de alimentos.

En cuanto a la efectividad antimicrobiana de las películas conteniendo sorbato, es de importancia conocer los niveles de preservador necesarios para controlar el desarrollo superficial de microorganismos, a fin de garantizar la calidad microbiológica de un dado producto. Estos niveles estarán condicionados por las características de migración del sorbato en las películas estudiadas, las cuales podrían ser afectadas por la concentración del antimicrobiano.

3.1.2.3 Efecto de la presencia de lípidos en la formulación de las películas

El agregado de un componente lipídico, como un aceite vegetal, a un medio esencialmente acuoso, determina la creación de un nuevo sistema con la presencia de dos fases inmiscibles o parcialmente miscibles. Estos sistemas pueden ser tratados mecánicamente a fin de lograr la dispersión de una de estas fases, en forma de microgotas contenidas en la fase circundante mayoritaria. Si las microgotas, o fase dispersa, están constituidas por la fase oleosa y el líquido circundante, o fase continua, es acuoso, estamos en presencia de una emulsión del tipo o/w (oil/water o aceite en agua).

La mayoría de las emulsiones están constituidas por tres regiones que poseen diferentes propiedades fisicoquímicas: el interior de las gotas, la fase continua y la interfase. Las moléculas en una emulsión se distribuyen entre estas tres regiones de acuerdo a su concentración y polaridad (Wedzicha, 1988).

Cabe destacar que la estabilidad microbiológica de la emulsión también podría verse afectada por esta partición de aditivos entre las fases e interfase, ya que algunos preservadores utilizados en estos sistemas alimenticios tienden a particionarse entre las distintas fases del sistema con la consiguiente pérdida de actividad antimicrobiana en la fase acuosa de la emulsión donde debieran ejercer su acción (Kurup y col., 1991; Wedzicha y Ahmed, 1994). Ejemplos claros de este fenómeno lo constituyen los ácidos orgánicos débiles como el sórbico y el benzoico.

En comparación con otros preservadores, los sorbatos poseen un coeficiente de partición lípidos / agua más favorable que el benzoato, razón por la cual son empleados en la elaboración de mayonesas, margarinas y aderezos (Sofos, 1989).

Por lo tanto, la presencia de lípidos en películas puede determinar la distribución del antimicrobiano y condicionar su efectividad.

3.1.2.4 **Efecto del tipo del almidón. Entrecruzamiento**

a) Modificaciones químicas del almidón

El uso del almidón, en muchas aplicaciones industriales, depende de su estructura granular, solubilidad en agua fría, dispersabilidad coloidal durante el calentamiento, habilidad para formar películas, capacidad ligante, habilidad como espesante y estabilizante y contribución textural. Las modificaciones químicas sirven como una poderosa herramienta para expandir el espectro de propiedades y usos del almidón. Estas modificaciones usualmente involucran la adición de grupos funcionales sobre las cadenas lineales de unidades de glucosa de las moléculas de almidón, cambiando así el tamaño molecular y características viscosantes del almidón. La respuesta del almidón a los tratamientos químicos dependerá de su origen, tipo e historia (White y Tziotis, 2004).

La modificación química puede ser llevada a cabo en tres estados del almidón:

- En suspensión: generalmente dispersado en agua, la reacción química es llevada a cabo en medio acuoso. La suspensión es luego filtrada, lavada y secada.
- En pasta: el almidón es gelatinizado en presencia de químicos en pequeñas cantidades de agua. La pasta es agitada, y cuando la reacción es completada, el almidón se seca al aire.
- En estado sólido: el almidón seco es humidificado con químicos disueltos en agua, secado al aire y finalmente se lleva a cabo la reacción a alta temperatura (> 100°C).

Las modificaciones químicas más comunes incluyen: oxidación, esterificación y eterificación. La modificación química del almidón resulta en estabilidad molecular aumentada contra daño mecánico, acidificación e hidrólisis a alta temperatura; obtención de la viscosidad deseada, incrementada interacción con iones, sustancias electronegativas o electropositivas (Xie y col., 2005).

Los modificadores químicos y sus niveles permitidos en almidones de uso alimenticio están contemplados en la legislación pertinente de cada país.

b) Entrecruzamiento del almidón

El almidón contiene dos tipos de hidroxilos: los primarios sobre el carbono 6 y los secundarios sobre los carbonos 2 y 3, capaces de reaccionar con agentes multifuncionales obteniéndose almidones entrecruzados. El entrecruzamiento ha sido pensado para restringir el hinchamiento del gránulo de almidón bajo condiciones de cocción o para prevenir la gelatinización. El entrecruzamiento del almidón es efectuado por un bajo nivel de reactivo. Las moléculas de almidón son cadenas largas poliméricas dispuestas muy cercanamente unas con otras, dentro de los gránulos. Estas moléculas pueden ser interconectadas por reacciones con cantidades traza de reactivos multifuncionales (White y Tziotis, 2004).

Los reactivos permitidos en general por las legislaciones alimentarias, para entrecruzar almidones de grado alimenticio son: cloruro de fosforilo, trimetafosfato de sodio (STMP), anhídrido acético y mezclas de STMP con tripolifosfatos. Ya no son utilizadas las epiclorhidrinas por los fabricantes de almidones modificados, debido a que son carcinógenas (Xie y col., 2005).

El almidón entrecruzado con oxiclорuro de fósforo es una reacción rápida la cual produce un fosfato dialmidonáceo. La reacción es especialmente efectiva a pH superiores a 11 y en presencia de sulfato de sodio (2%, en base de almidón).

El STMP, un sólido no peligroso, es otro agente de entrecruzamiento. La reacción procede lentamente para dar un fosfato dialmidonáceo (Figura 3.1). Sin embargo la reacción puede ser acelerada por incremento del pH y de la concentración de sulfato de sodio.

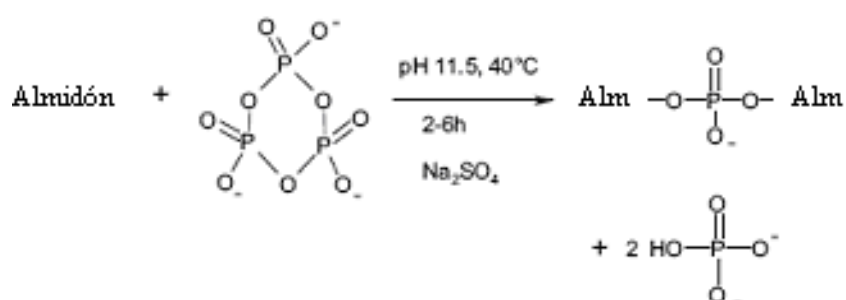


Figura 3.1 Reacción de entrecruzamiento del almidón con STMP

La determinación química de la extensión de la reacción es difícil, ya que se usan niveles muy bajos de reactivos en el entrecruzamiento. En el caso de utilizar reactivos fosforilantes, la resonancia magnética de ³¹P ha mostrado ser útil para medir el nivel de incorporación de fosfatos en el almidón. Los métodos físicos relacionados al cambio en el hinchamiento de los gránulos de almidón son también usados para medir el

entrecruzamiento. Tres métodos populares incluyen la medición de la fluidez, claridad óptica y la obtención de las curvas de empastado (Xie y col., 2005)

Los enlaces químicos generados en el entrecruzamiento pueden mantener la integridad del gránulo para preservar los gránulos hinchados intactos, y por ende, previenen la pérdida de viscosidad y proveen resistencia a la agitación mecánica. Aumentando el nivel de entrecruzamiento, se reducirá eventualmente, el hinchamiento del gránulo y la disminución de la viscosidad. A niveles altos de entrecruzamiento, se prevendrá completamente al gránulo de su hinchamiento y el almidón no podrá ser gelatinizado en agua hirviente, aún bajo condiciones de autoclave.

También, el entrecruzamiento previene la ruptura del gránulo y la pérdida de viscosidad bajo condiciones ácidas.

Un bajo nivel de entrecruzamiento puede eliminar la gomosidad, cohesividad, y textura fibrosa de los almidones nativos cocidos, en particular del almidón bajo en amilosa y del almidón proveniente de tubérculos. El almidón entrecruzado tiene una textura del tipo pasta corta con propiedades reológicas particularmente útiles para su uso como espesante de alimentos (Hoseney, 1991).

c) ***Aplicaciones del almidón entrecruzado***

Los almidones entrecruzados se usan en aderezos para ensaladas ya que proveen el espesamiento requerido, con viscosidad estable a bajo pH y alta agitación, tal cual ocurre durante el proceso de homogeneización.

Por poseer una baja velocidad de gelatinización, son empleados en productos enlatados donde se aplica la esterilización. Estos almidones poseen una baja viscosidad inicial, alta transferencia de calor y rápido incremento de la temperatura, lo cual los hace particularmente aptos para la esterilización rápida (BeMiller, 1996).

También han sido aplicados en sopas, salsas, jarabes, alimentos para bebés, budines y alimentos para freír. Pueden proveer una textura de pulpa a ciertos alimentos. Han sido usados para mejorar el volumen de tartas y la suavidad de la miga del pan.

El entrecruzamiento es generalmente empleado en combinación con otros métodos de modificación del almidón, tales como oxidación, hidrólisis, eterificación y esterificación (monosustituyentes), a fin de proveer propiedades de gelatinización, viscosidad y textura apropiadas para una dada aplicación en alimentos (White y Tziotis, 2004).

La literatura relativa a la investigación en áreas de la industria farmacéutica, ha reportado numerosos trabajos donde el grado de entrecruzamiento de un hidrocoloide

modifica las propiedades difusionales de ciertas drogas. En este caso, el problema a resolver es el control de la liberación de un fármaco soportado en un comprimido elaborado con almidón como excipiente. Dumoulin y col. (1998) informaron que tabletas de amilosa entrecruzada a bajos niveles, fueron efectivas en controlar la liberación de teofilina, debido a un aumento en la estabilización de las cadenas poliméricas por puentes de hidrógeno, lo cual provocó una matriz más resistente a la hidratación y, por ende, más apropiada para controlar la liberación de la droga.

Algunos autores han reportado los mecanismos difusivos del sorbato de potasio a través de películas comestibles elaboradas con otros hidrocoloides, tales como proteínas del suero láctico (Ozdemir y Floros, 2000) y κ -carragenano (Choi y col., 2005); o bien a través de materiales sintéticos destinados a funcionar como embalajes activos de alimentos (Han, 2000).

Sin embargo, no se encuentra demasiada información con respecto al comportamiento de los sorbatos soportados en películas elaboradas con almidón, y menos aún de la influencia del nivel de entrecruzamiento en las características de migración de este preservador.

3.1.3 Objetivos

Considerando que es de vital importancia determinar el óptimo desempeño del KS incorporado a las películas comestibles en relación a los factores que afectan su comportamiento, en el presente capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

✓ Estudiar la influencia de cambios en la formulación de las películas en el desempeño como antimicrobiano de los sorbatos soportados en ellas.

Para ello se procedió a:

- ✓ Examinar el efecto del descenso del pH y del contenido de KS.
- ✓ Evaluar la efectividad del preservador en presencia de un lípido en la película.
- ✓ Observar los cambios producidos en la disponibilidad del sorbato de potasio debido al uso de almidón entrecruzado en la elaboración de las películas.

Adicionalmente, se determinaron los cambios producidos en algunas propiedades físico-químicas de las películas debido a los cambios de formulación propuestos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Cambios en la formulación de películas comestibles.

Se realizaron los siguientes cambios en la formulación de las películas a fin de analizar su efecto en la actividad del sorbato de potasio (KS):

- Cambios de pH y contenido de sorbato de potasio
- Incorporación de aceite de soja
- Modificación química del almidón de mandioca por entrecruzamiento.

En todos los casos, el procedimiento básico utilizado para la elaboración de las películas fue el correspondiente al “método 2”, descrito en la sección 1.2.1.2 del Capítulo 1, con las modificaciones necesarias que se detallan a continuación. Previamente a los ensayos, las películas fueron estabilizadas en atmósfera de NaBr (a_w : 0,576) durante 7 días.

3.2.1.1 Cambios de pH y contenido de sorbato de potasio de las películas

a) Disminución del pH de la suspensión de almidón de partida a 4,5 y 3,0 mediante el agregado de ácido cítrico 50% (m/m). Se comparó el desempeño de los sorbatos en estos sistemas con el desempeño de los sorbatos soportados en películas de pH sin modificar (6,5).

El pH de las suspensiones iniciales se evaluó a 25°C con un electrodo de vidrio conectado a un pHmetro (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA).

Debido a la disminución de la solubilidad del sorbato de potasio con el pH, fue también necesario disminuir la cantidad de preservador incorporado a las películas; en el caso contrario, se obtenían recubrimientos con presencia de precipitados en forma de agujas.

Una vez constituidas las películas y estabilizadas en atmósfera de solución saturada de NaBr, se determinó el pH de las mismas adaptando la metodología recomendada por la norma ASTM D778-97(2002), para determinación de pH en papel. En nuestro caso se sumergieron trozos de película en agua destilada (proporción 1 g de película : 30 mL de agua), se dejó estabilizar 5 minutos y se midió el pH del extracto acuoso, a 25°C y empleando un electrodo de vidrio.

b) Disminución del contenido de sorbato de potasio incorporado a la suspensión de almidón inicial. El pH original de estos sistemas no fue modificado.

En la Tabla 3.1 se observan las modificaciones realizadas en cuanto a valores de pH y concentración de sorbato de las formulaciones de partida de las películas.

Tabla 3.1 Cambios en el valor de pH y contenido de sorbato

Denominación	pH nominal ^a	[KS] nominal ^a (g/Kg)
6,5 SS	6,30	0
6,5 10	6,50	1
6,5 20	6,50	2
6,5 30	6,50	3
4,5 15	4,50	1,5
4,5 SS	4,50	0
3,0 10	3,00	1
3,0 SS	3,00	0

^a: valores de pH y de concentración de KS de las suspensiones iniciales

3.2.1.2 Incorporación de aceite de soja

Aceite de soja comercial (Sojola, Molinos S.A., Argentina) fue incorporado a la formulación de las películas comestibles, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

- **Elaboración de las películas**

En este caso se disminuyó la cantidad de agua incorporada a la suspensión inicial de almidón, a fin de no modificar las proporciones de los ingredientes de la mezcla (almidón, glicerol y sorbato), debido al agregado de aceite.

Una vez obtenido el gel y estando el mismo a una temperatura de 82°C, se agregaron 0,675 mL de aceite de soja (0,6 g) medidos con pipeta automática. Esta cantidad de lípido significó una concentración de 0,2% (m/m) de aceite en la suspensión inicial y corresponde a la máxima concentración adecuada para obtener una película auto-soportada, ya que de acuerdo a ensayos previos realizados con concentraciones más elevadas de aceite (0,4% y 1%), no fue posible separar el gel deshidratado de las placas de petri en las cuales se constituían.

Inmediatamente después del agregado del aceite, se generó una emulsión aceite en agua, dispersando el lípido con un equipo Ultra Turrax (elemento dispersor S25N - 18G, Staufen, Germany). Se seleccionó una velocidad de 13500 RPM durante 5 minutos.

Este procedimiento introdujo una cantidad importante de aire al gel de almidón. Por ello, una vez obtenida la emulsión se procedió, a la eliminación de las burbujas de aire aplicando vacío durante 15 minutos. Luego, la suspensión fue vertida sobre placas de petri de 5 cm de diámetro, sometida a secado y posterior estabilización sobre NaBr.

- ***Observación de las películas obtenidas a partir de una emulsión por microscopía óptica***

A fin de examinar la forma y disposición de las gotas de aceite, las películas fueron observadas con un microscopio óptico (Nikon AFX II, Japón) equipado con cámara fotográfica (Nikon, FX-35, Japón). Para ello fue necesario aplicar un método de tinción a las películas con el objeto de facilitar la observación de la fase lipídica (Flint, 1996). Se probaron los colorantes:

- Sudan IV: colorea las grasas líquidas a través de un mecanismo de reparto, otorgándoles coloración roja-naranja. El colorante es más soluble en los glicéridos insaturados que en el solvente acuoso que lo soporta. La presencia de agua en el solvente reduce las pérdidas de lípido al teñir y sirve para hidratar otros constituyentes no grasos, evitando que se tiñan.
- Lugol: forma complejos de inclusión con el almidón de color azul, dando una coloración oscura al fondo (fase continua) y permitiendo observar las gotas de aceite (no teñidas) por contraste.
- Mezcla de Sudan IV y Lugol: Se tiñen la fase dispersa (aceite) y la fase continua (almidón) al mismo tiempo.

En todos los casos se cortaron rectángulos de película de, aproximadamente, 0,3 x 1 cm y se apoyaron sobre la superficie de un portaobjetos limpio. Se adicionaron gotas (2-3) de los respectivos colorantes sobre las muestras y se cubrieron con un cubreobjetos. La cantidad de colorante agregada fue la necesaria para que el área del cubreobjetos y, por ende, el área de la película, queden totalmente cubiertos con líquido. En el caso de una cobertura deficiente, se adicionó colorante a través del espacio generado entre cubre y portaobjeto. Se aguardaron 3 - 5 minutos antes de la observación.

También se observaron las películas sin teñir, a fin de apreciar directamente las características generales de las películas obtenidas a partir de la emulsión.

El aumento empleado para las observaciones fue de 100X y se fotografiaron campos seleccionados.

3.2.1.3 Modificación del almidón de mandioca: entrecruzamiento.

- **Reactivos**

- Almidón de mandioca (Bernesa S.A., Argentina)
- Trimetafosfato de sodio (STMP, Sigma, USA)
- Hidróxido de sodio (s) (Anedra, Argentina)
- HCl 0,2 N (Anedra, Argentina)

Todos los reactivos fueron de calidad analítica, a excepción del almidón de mandioca que fue de calidad alimenticia.

- **Reacción de entrecruzamiento**

i) Técnica C1: Se suspendieron 5 g de STMP en 30 mL de agua destilada y se llevaron a pH 10,5 mediante el agregado de NaOH sólido. El sistema se mantuvo con agitación. Se incorporaron a la suspensión 100 g de almidón de mandioca y se continuó agitando durante 3,5 horas a 25°C. Luego, el pH se ajustó a 6,5 agregando, aproximadamente, 28 mL de HCl 0,2 N. A continuación se procedió al filtrado al vacío de la suspensión empleando embudo Buchner con papel de filtro de fibra de vidrio y efectuando un lavado con agua destilada (250 mL). El material colectado en el embudo se resuspendió en agua destilada (300 mL) y se repitió el procedimiento de filtrado. Se empleó un volumen total de 2 L de agua destilada para el lavado (Atichokudomchai y Varavinit, 2002).

ii) Técnica C2: Se procedió de igual manera que en la Técnica C1 pero la reacción de entrecruzamiento fue llevada a cabo a 50°C, en un baño de agua.

En ambos casos el almidón entrecruzado resultante fue liofilizado durante 24 horas a fin de obtener el producto seco, envasado en bolsa de cloruro de polivinilo - cloruro de polivinilideno (Cryovac, Grace, USA), sellado al vacío y conservado a -18°C.

- **Caracterización del grado de entrecruzamiento**

Los almidones obtenidos a partir de las reacciones de entrecruzamiento empleadas, fueron caracterizados mediante las siguientes determinaciones:

a) Contenido de fósforo total: muestras de almidón nativo y entrecruzado ($\cong 250$ mg) se digirieron a reflujo en una mezcla de ácido nítrico / ácido perclórico, hasta desintegración total de la materia orgánica. Se efectuaron las diluciones apropiadas. La determinación de fósforo se realizó por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (Baird 2070, U.S.A.).

De acuerdo a Atichokudomchai y Varavinit (2002), el empleo de la siguiente ecuación permite estimar el grado de sustitución (DS) del almidón modificado:

$$DS = \frac{162P}{3100 - 102P}$$

donde P representa el contenido de fósforo (%) del almidón entrecruzado.

b) Espectrometría infrarroja (FT-IR): sendas muestras de almidón nativo y entrecruzado se mezclaron íntimamente con BrK (2% m/m) a fin de obtener bajo presión y aplicando vacío, una pastilla delgada. Se obtuvieron los espectros de transmitancia entre 400 y 4000 cm^{-1} en espectrofotómetro Nicolet 510P (U.S.A.).

c) Análisis calorimétrico (DSC): se prepararon suspensiones acuosas (20% m/m) de los almidones nativo y modificado dentro de cápsulas de aluminio (40 μL , Mettler), las cuales fueron selladas herméticamente y almacenadas durante 24 horas a 25°C, previo a la realización del ensayo. Se utilizó un equipo Mettler TA 4000, calibrado con Indio, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min y se empleó una cápsula vacía como referencia.

3.2.2 Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio

El desempeño de los sorbatos soportados en las películas obtenidas, fue estudiado a través de la evaluación de la efectividad del antimicrobiano liberado a un medio líquido y como barrera a la contaminación por levaduras en productos de pH 4,5 y alta a_w (0,98).

El microorganismo indicador empleado fue *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256.

3.2.2.1 Preparación del inóculo

Un inóculo de *Z. bailii* fue preparado resuspendiendo una ansada del microorganismo en 10 ml de caldo Sabouraud e incubando posteriormente a 25°C durante 24 horas. La población de levaduras obtenida en el inóculo fue aproximadamente de $5 \cdot 10^6$ UFC/mL.

3.2.2.2 Efectividad del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano

El procedimiento aplicado fue similar al descrito para el estudio de la efectividad del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento microbiano (Capítulo 2, sección 2.2.3.2).

Se estudiaron películas conteniendo sorbato de potasio, como así también películas libres del preservador, a fin de analizar la influencia del resto de los componentes en el crecimiento de la levadura.

Las curvas de crecimiento obtenidas se modelaron mediante la ecuación de Gompertz, tal como se describió en la sección 2.2.3.2. El análisis estadístico de los parámetros obtenidos también fue descrito en dicha sección.

3.2.2.3 Efectividad de películas conteniendo sorbato de potasio como barrera a la contaminación externa

La metodología empleada fue análoga a la aplicada para el estudio del desempeño como barrera antimicrobiana de películas usadas como recubrimiento de un alimento modelo semisólido (Capítulo 2, sección 2.2.3.3, ítem b).

3.2.3 Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia en las propiedades físico-químicas

Con el objeto de evaluar el efecto del cambio de formulación en las propiedades físico-químicas, se elaboraron películas con las siguientes variantes en su composición:

- Incorporación de aceite de soja
- Modificación química del almidón de mandioca: entrecruzamiento

La elaboración de estas películas fue detallada en las secciones 3.2.1.2 y 3.2.1.3 del presente capítulo.

- **Propiedades físico-químicas evaluadas**

El cambio en el desempeño de las películas, se estudió mediante la determinación de las siguientes propiedades físico-químicas:

- Cristalinidad
- Contenido de humedad
- Solubilidad en agua
- Propiedades sorcionales: Isotermas de sorción de vapor de agua

CAP. 3 - Modificaciones en la formulación de películas comestibles. Su influencia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio y en las propiedades físico-químicas.

- Permeabilidad al vapor de agua
- Atributos de color
- Contenido de sorbato

En todos los casos, la metodología empleada se encuentra detallada en la sección 1.2.2 del Capítulo 1.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los siguientes apartados se describirá los resultados obtenidos en relación a los estudios de biodisponibilidad del sorbato de potasio (KS) soportado en películas comestibles elaboradas con distintos niveles de pH y sorbato, como así también las elaboradas con incorporación de aceite de soja y las fabricadas con almidón entrecruzado.

Debido a las características de gelatinización de los almidones entrecruzados obtenidos, las cuales son informadas más adelante, se elaboraron películas a partir del almidón producido con la técnica C1 (sección 3.2.1.3), obteniéndose recubrimientos auto-soportados, transparentes y homogéneos.

3.3.1 Cambios en la formulación de películas comestibles. Estudios preliminares

3.3.1.1 Incorporación de aceite de soja

- ***Elaboración de las películas***

Al trabajar con estos sistemas, luego del secado se obtuvieron películas más frágiles que las obtenidas en ausencia de aceite. Ello podría deberse a que el procedimiento a través del cual se obtuvo la emulsión o/w, provocó la ruptura de los gránulos de almidón hinchados debido a la fuerza de cizalla ejercida por el elemento dispersor. Por otro lado, la formación de un sistema heterogéneo del tipo emulsión aceite en agua, podría estar condicionando las propiedades mecánicas de las películas. Es de destacar que Biliaderis (1994) informó que la presencia de lípidos interfiere en la formación de los geles basados en almidón, por asociación de compuestos lipofílicos con las cadenas de amilosa (complejos de inclusión).

- ***Observación por microscopía óptica***

- Tinción con Sudán IV: La Figura 3.2 panel A muestra la disposición de las gotas de aceite dispersas en la matriz de almidón.

Por tratarse de un colorante lipofílico, el Sudán IV se disuelve en la fase oleosa otorgándole coloración naranja-roja. En la imagen se aprecian las gotas de aceite con bordes bien definidos y distribuidas uniformemente por la matriz amilácea.

- Tinción con Lugol: En la Figura 3.2 panel B la distribución de las gotas se observa con menor nitidez. La matriz de almidón no se encuentra teñida uniformemente, haciendo difícil la visualización de las gotas por contraste.

- Tinción con mezcla de Sudan IV y Lugol (Figura 3.2 panel C): en este caso las gotas de lípido se ven parcialmente teñidas, al igual que el fondo (matriz de almidón). No se obtuvo una mejora en cuanto al contraste de las fases.

Finalmente, en la Figura 3.2 panel D se muestra la imagen de la película tal cual, sin tratamiento de tinción. Se aprecian numerosas discontinuidades de forma circular, las cuales pueden corresponder a gotas de aceite y/o aire. También, se hace notorio un leve cambio en la forma de las gotas cuando se agrega un colorante: se produce un ligero ovalado debido, posiblemente, al hinchamiento de las películas por absorción del solvente que soporta al agente de tinción.

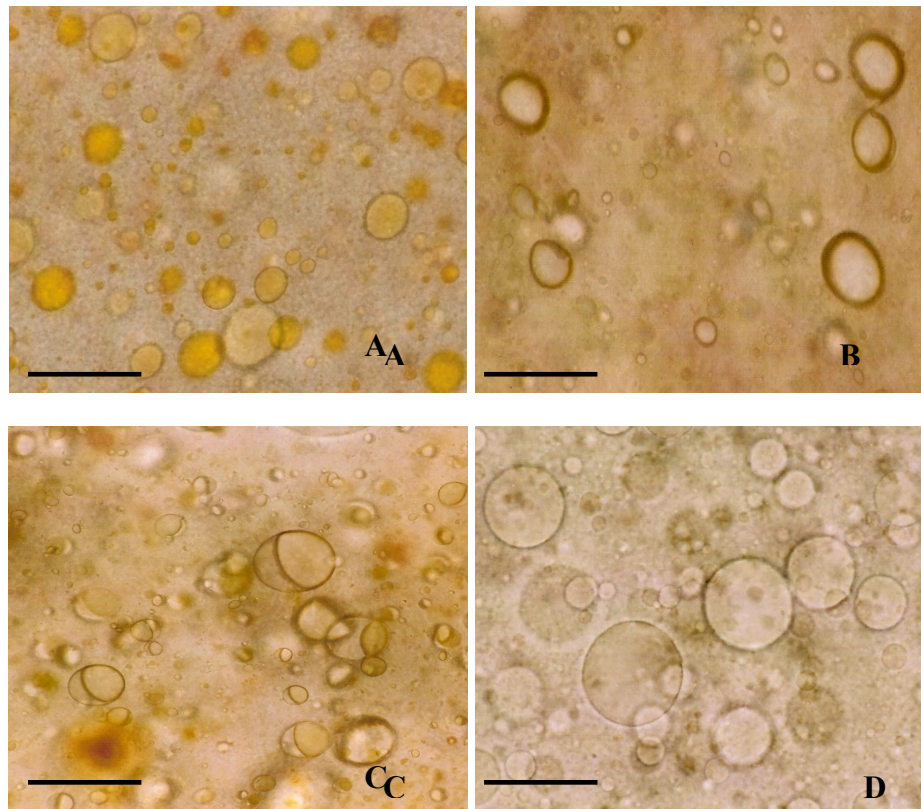


Figura 3.2 Película obtenida a partir de una emulsión o/w. A) Tinción con Sudan IV, B) Tinción con Lugol, C) Tinción con mezcla de Sudan IV y Lugol, D) Película sin teñir. Aumento: 100x. Barra: 100 μm .

3.3.1.2 Entrecruzamiento del almidón de mandioca

Las reacciones de entrecruzamiento practicadas al almidón de mandioca nativo, afectaron su contenido de fósforo total, sus características de gelatinización y su

espectro IR pero no afectaron sus propiedades calorimétricas (DSC), tal como se describe a continuación.

- **Caracterización del grado de entrecruzamiento**

- a) Contenido de fósforo total**

Los resultados del análisis de fósforo total se resumen en la Tabla 3.2

Puede apreciarse, que la reacción de entrecruzamiento aumentó la cantidad de fósforo de los almidones tratados.

Tabla 3.2 Contenido de fósforo total en las muestras de almidón

Almidón	Fósforo total (mg / 100 g)	DS
Nativo	9,4 (CV = 1,5%)	0,0005
Entrecruzado C1	14,8 (CV < 1,0%)	0,0008
Entrecruzado C2	26,4 (CV = 13%)	0,0014

DS: grado de sustitución

La concentración total de fósforo en el almidón nativo resultó menor que la reportada para otros almidones de diferente origen. Esta condición podría ser característica de almidones de mandioca locales. Atichokudomchai y Varavinit (2002) trataron con STMP, NaOH y Na₂CO₃ un almidón de tapioca nativo cuyo contenido de fósforo total era de 20 mg /100 g, el cual se elevó luego del entrecruzamiento, a 90 mg /100g. Por otro lado, Séker y Hanna (2005) informaron que extrudados de almidón de maíz con STMP e hidróxido de sodio, incrementaron la concentración de fósforo desde 20mg /100 g (nativo) a 500 mg /100 g (modificado).

Comparativamente, las reacciones llevadas a cabo en este trabajo, mostraron un incremento bastante menor. Sin embargo, fue suficiente para provocar cambios en las características de gelatinización de estos almidones: suspensiones acuosas (5% m/m) tratadas térmicamente en iguales condiciones (calentamiento sobre platina calefactora a 100°C con agitación), resultaron en un gel que fluía a temperatura ambiente en el caso del almidón nativo, un gel consistente (no fluía al invertir el recipiente) en el caso de C1 y no se logró obtener un gel cuando se trató el almidón C2. En este último caso se pudo apreciar que el almidón incorporaba una cantidad de agua mínima, y que los gránulos permanecían suspendidos, hidratados y pegajosos.

Este cambio en la textura de la pasta de los geles de los almidones nativo y C1, se ha denominado acortamiento de la pasta (Figura 3.3). La pasta corta se maneja bien con la cuchara presentando un corte agudo, mientras que la pasta larga tiende a ser

filamentosa y no se maneja bien con la cuchara presentando una amplia deflexión (Hoseney, 1991).

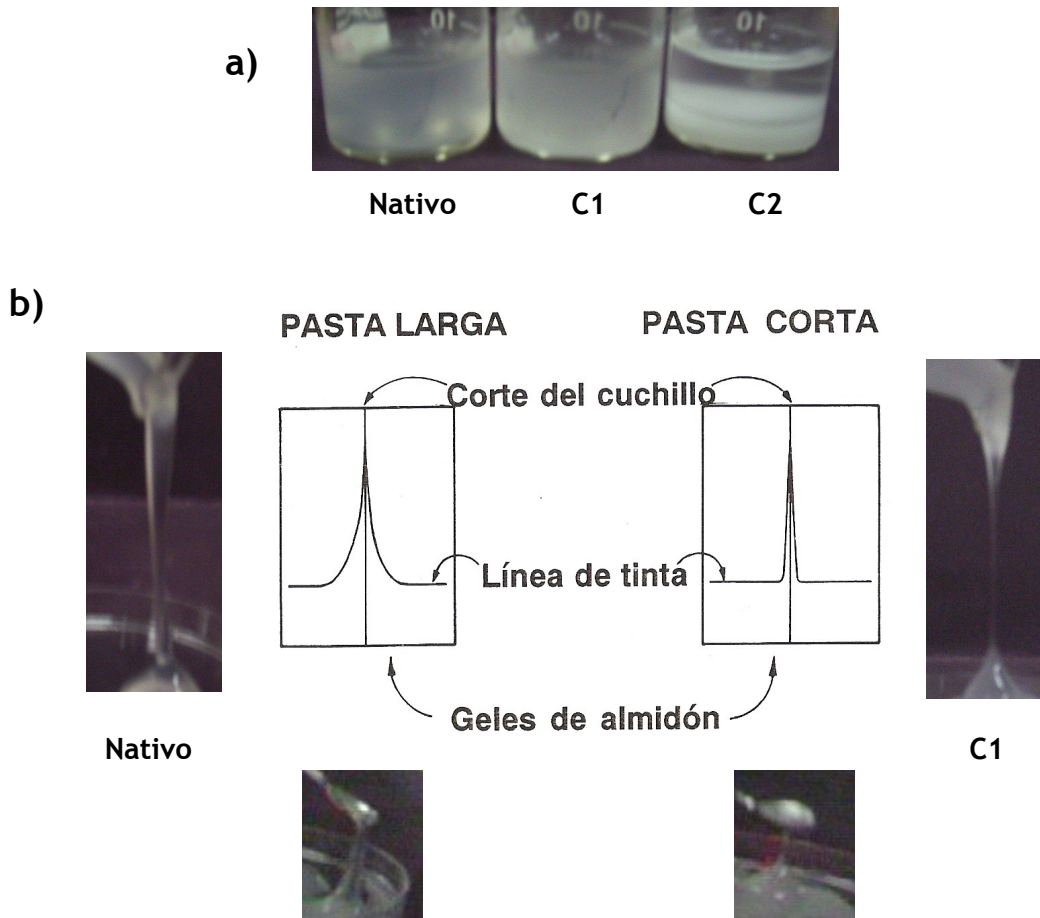


Figura 3.3 a) Suspensiones de almidón de mandioca nativo y entrecruzado con STMP (C1 y C2) luego del tratamiento térmico a 100°C. b) Esquema de la prueba de las pastas de almidón cortas o largas.

Para lo observado con el almidón C2, se infiere que el DS alcanzado en este caso, previene al gránulo del hinchamiento dificultando su gelatinización (Xie y col., 2005).

Los diferentes comportamientos observados, provendrían del aumento de interconexiones entre las cadenas poliméricas del almidón a través de puentes diéster fosfato. Estos puntos de conexión refuerzan la estructura del gránulo, en menor o mayor medida dependiendo del DS logrado, restringiendo el hinchamiento del gránulo.

b) Espectrometría infrarroja (FT-IR)

En la Figura 3.4 se muestran los espectros de transmitancia de los almidones nativo y entrecruzados.

La aparición de una banda en la zona de 1299-1250 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo éster fosfato (Silverstein, 1991) evidencia el incremento de la fosforilación en los almidones entrecruzados C1 y C2.

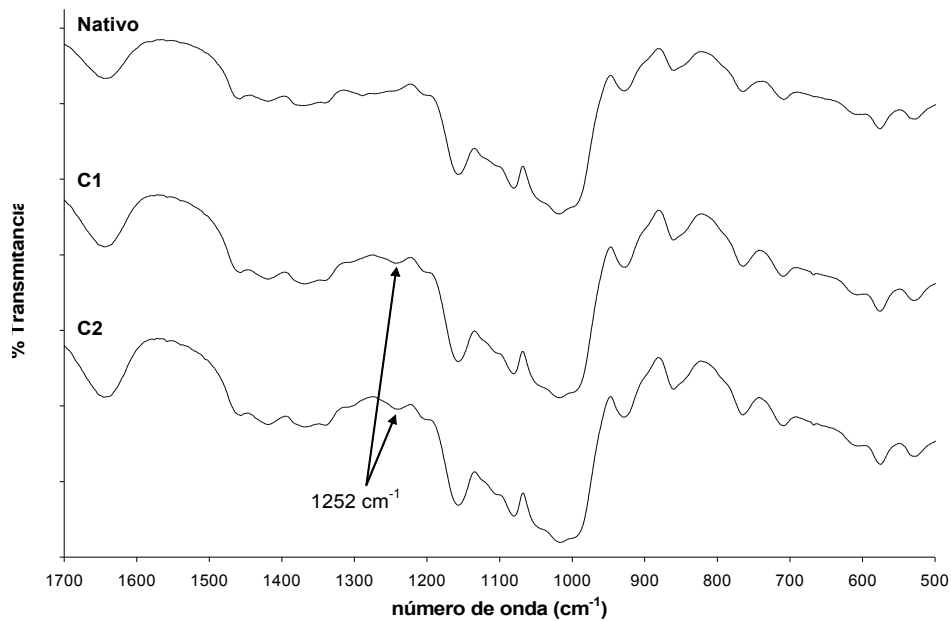


Figura 3.4 espectros FT-IR de los almidones nativo y entrecruzados en el rango de 1700 y 500 cm^{-1} .

c) **Análisis calorimétrico (DSC):** en la Figura 3.5 se muestran los termogramas de los almidones nativo y entrecruzado C1 en el rango de 40 a 90°C. El estudio calorimétrico del evento de gelatinización del almidón C2 no fue realizado por las características antes descritas para el mismo (ítem a).

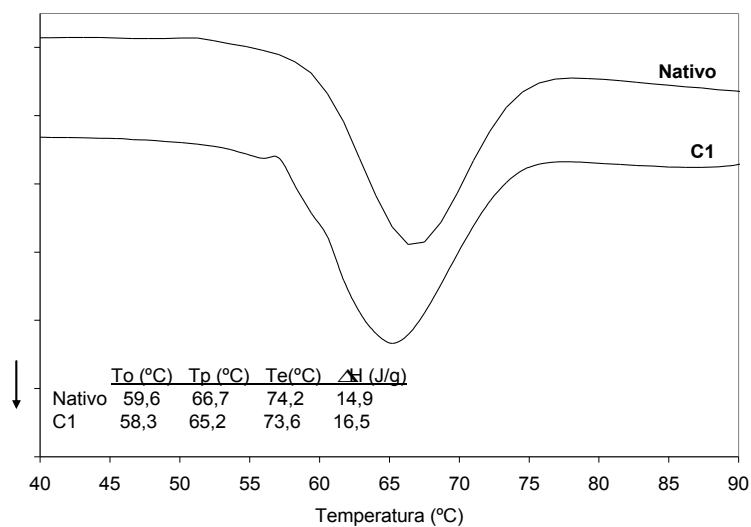


Figura 3.5 Termogramas de los almidones nativo y C1 en el rango de 40 a 90°C.

Las temperaturas de gelatinización (nativo: 66,7°C; C1: 65,2°C) y los correspondientes calores (ΔH nativo: 14,9 J/g, ΔH y C1: 16,5 J/g), no fueron significativamente diferentes. Atichokudomchai y Varavinit, (2002) reportaron que las entalpías de gelatinización de almidones de mandioca nativo y entrecruzado con STMP fueron similares, sugiriendo una completa fusión de las regiones cristalinas en ambos almidones. Blennow y col. (2000), informaron que no fue posible hallar una correlación entre propiedades térmicas, como la entalpía de gelatinización y la amplitud del pico endotérmico determinados por DSC, y el contenido de fosfato covalentemente enlazado a los glucanos del almidón.

3.3.2 Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio liberado a un medio líquido para controlar el crecimiento de *Z.bailii*

3.3.2.1 Efecto del cambio del pH y del contenido de sorbato de potasio

- **Determinación del pH y contenido de sorbato**

En la tabla 3.3 se detalla el nivel de pH y concentración de KS de las películas estudiadas.

Tabla 3.3 Cambios en el valor de pH y contenido de KS de las películas

Denominación	pH película ^{a, b}	[KS] película ^{a, c} (g/kg)
6,5 SS	6,48	--
6,5 10	6,57	10,80 ± 0,54
6,5 20	6,66	23,00 ± 0,60
6,5 30	6,75	32,16 ± 1,82
4,5 15	5,02	5,73 ± 0,21
4,5 SS	4,73	--
3,0 10	3,19	4,35 ± 0,16
3,0 SS	3,09	--

^a: pH y concentración de KS de las películas

^b: el error en la lectura de pH se estima en 0,02 unidades

^c: promedio de cuatro determinaciones y su desvío estándar

i) Disminución del pH

En la Figura 3.6 paneles A y B, se aprecian las curvas de crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud a pH 4,5 y 3,0 en presencia de las películas 3,0 10 y 6,5 10. Las curvas fueron modeladas según la ecuación de Gompertz y los parámetros obtenidos se resumen en la Figura 3.7.

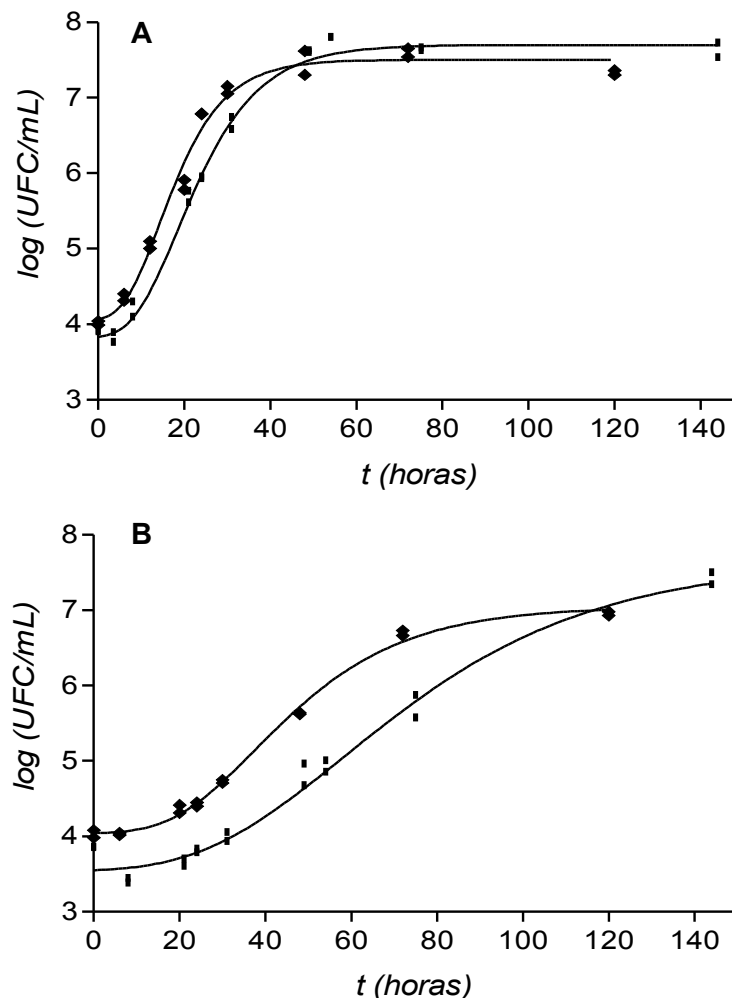


Figura 3.6 Crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud ajustado a diferentes valores de pH. UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL. Panel A: caldo de pH 4,5; panel B: caldo de pH 3,0. \blacklozenge películas pH 3,0 10; \blacksquare películas pH 6,5 10. — Ajuste de la ecuación de Gompertz.

Se observó que el descenso del pH de las películas de 6,5 a 3,0, no ejerció un cambio significativo en la curva de crecimiento a pH 4,5. En este caso, la levadura se desarrolló luego de una fase lag de aproximadamente 7 horas, alcanzando la fase estacionaria a las 48 horas de incubación, la cual presentó un incremento en la población de 3,5 ciclos log. En el caldo a pH 3,0 (Figura 3.6, panel B), también se observó crecimiento del microorganismo pero a una menor velocidad que en el medio receptor de pH 4,5. Al comparar el desempeño de estas películas a los dos pHs del caldo receptor estudiados, se vio que la velocidad de crecimiento fue levemente mayor y el tiempo lag menor para el sistema con la película 3.0 10 (Figura 3.7, paneles A y B), hechos que pueden atribuirse a la menor carga de KS contenida en dicha película (Tabla 3.3).

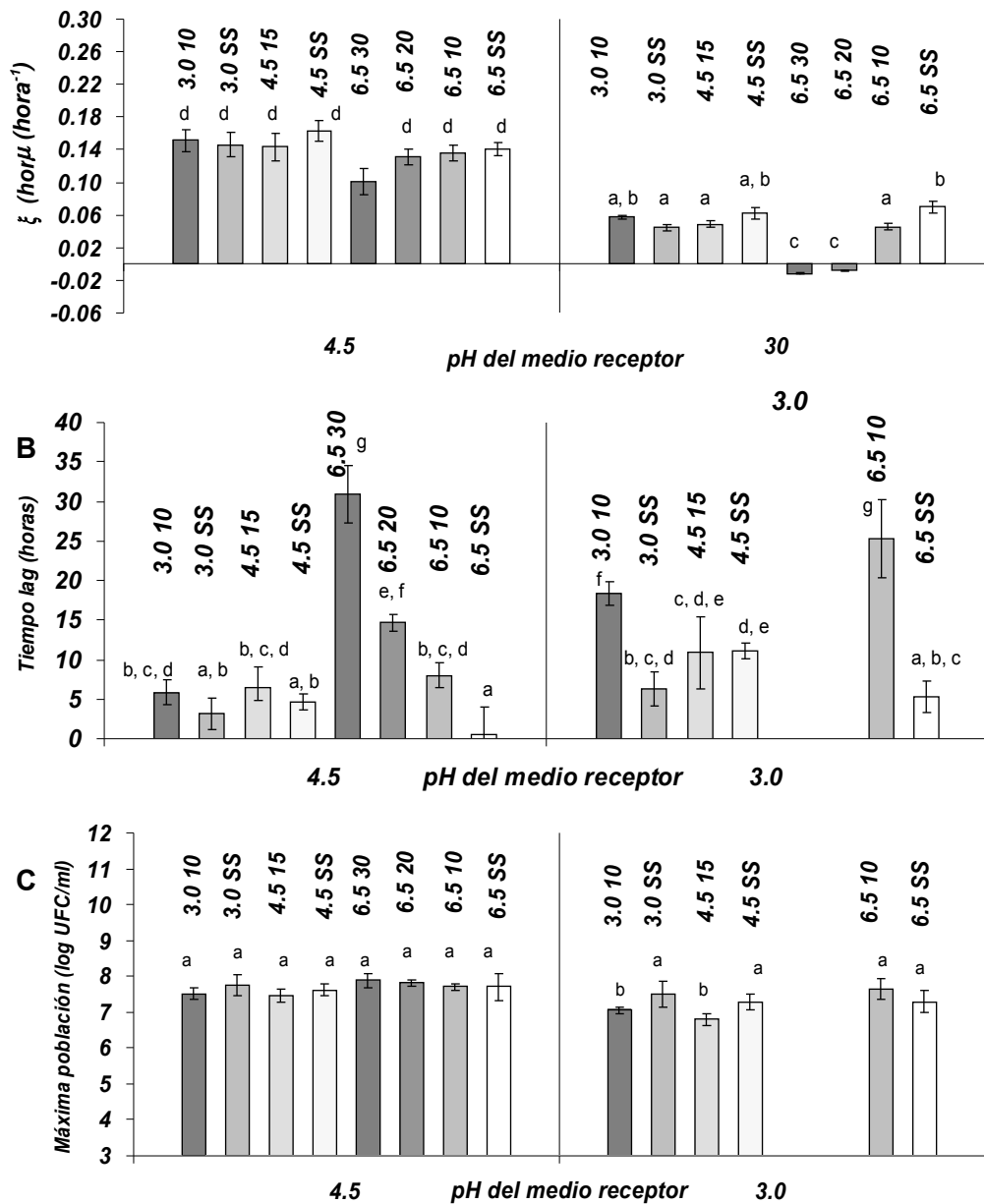


Figura 3.7 Parámetros de crecimiento obtenidos con la ecuación de Gompertz y ajuste lineal de las curvas de crecimiento de *Z. bailii* en caldos Sabouraud a pHs 4,5 y 3,0, conteniendo películas comestibles. Panel A: velocidad de crecimiento específica; Panel B: tiempo lag; Panel C: máxima población de células. Barras con igual letra no difieren significativamente (α : 0,05).

En este ensayo, la cantidad de KS liberada al medio determinó una concentración de KS de 0,046 g/L (caldo a pH 4,5) y 0,050 g/L (caldo a pH 3,0) para los sistemas conteniendo películas 3,0 10, y de 0,12 g/L (caldo a pH 4,5) y de 0,13 g/L (caldo a pH 3,0) para los sistemas conteniendo películas 6,5 10. Estas concentraciones de KS fueron, en todos los casos, inferiores a la MCI del preservador necesaria para

evitar el crecimiento de *Z.bailii* a los dos pHs del medio receptor. Asimismo, se destaca que la fracción de KS liberado al medio estuvo entre 0,94 y 0,98, reconfirmando el alto grado de transferencia del preservador soportado en películas de almidón cuando éstas se ponen en contacto con un medio acuoso.

Estos resultados sugieren que el descenso de pH propuesto como cambio en la formulación de las películas, no introdujo una mejora sustancial en cuanto a la actividad antimicrobiana del KS en medios líquidos con pH ajustado a 4,5 y 3,0.

La Figura 3.8 (paneles A y B) muestra el desarrollo de la levadura en caldo Sabouraud a pH 4,5 y 3,0 y en presencia de películas elaboradas con distinto pH. Debido a que las películas sin KS, para todo nivel de pH, permitieron un desarrollo semejante de la levadura en caldo de pH 4,5 y 3,0, en la Figura 3.8 paneles A y B se muestra sólo la curva de crecimiento correspondiente a la película de pH sin modificar (6,5 SS). Los parámetros resultantes del modelado de las curvas utilizando la ecuación de Gompertz pueden observarse en la Figura 3.7.

Los resultados revelaron que las películas 3,0 10 y 4,5 15 tuvieron un desempeño similar a las películas libres de preservador (no inhibitorio), ya sea que el pH del caldo receptor fuera 4,5 o 3,0. Solamente las películas con mayor contenido de sorbato (6,5 30) mostraron capacidad inhibitoria hacia el crecimiento de la levadura: mayor fase lag de, aproximadamente, 30 hs, en el caldo a pH 4,5 y muerte de microorganismos en el caldo a pH 3,0.

Estos perfiles de crecimiento revelan que la reducción del pH apareada a una reducción de la cantidad de sorbato de potasio en la formulación de las películas, determinaron que no se diesen las condiciones para impedir el crecimiento de *Z.bailii* cuando, aproximadamente 1,3 g de película fueron puestas en contacto con 100 mL de caldo Sabouraud a pH 4,5 o 3,0 e inoculado con la levadura estudiada.

La cantidad de KS determinada en los medios líquidos fue, como se mencionó más arriba, de 0,046 g/L y 0,050 g/L para las películas 3,0 10 en los medios a pH 4,5 y 3,0 respectivamente. Mientras que para la película 4,5 15 las fracciones de liberación de KS fueron 0,92 y 0,97, y las concentraciones halladas fueron de 0,063 g/L y de 0,058 g/L en los caldos a pH 4,5 y 3,0 respectivamente. Estas cantidades, proporcionan un nivel de antimicrobiano en el caldo muy por debajo de la MCI necesaria para evitar el desarrollo de *Z.bailii* en caldo Sabouraud con pH reducido a 4,5 o 3,0. Recordemos que algunos valores de MCI reportados para el KS son: 0,300 g/L a pH 3,0 (Gliemmo y col., 2004); 0,400 g/L a pH 3,5 (Castro y col., 2002); 1,005 g/L a pH 5,0 (Praphailong y col., 1997). Para la película 6,5 30, las concentraciones de KS determinadas en los caldos

fueron 0,464 g/L y 0,481 g/L a pHs 4,5 y 3,0 respectivamente. En este caso se supera la MCI para la levadura en caldo Sabouraud a dichos pHs.

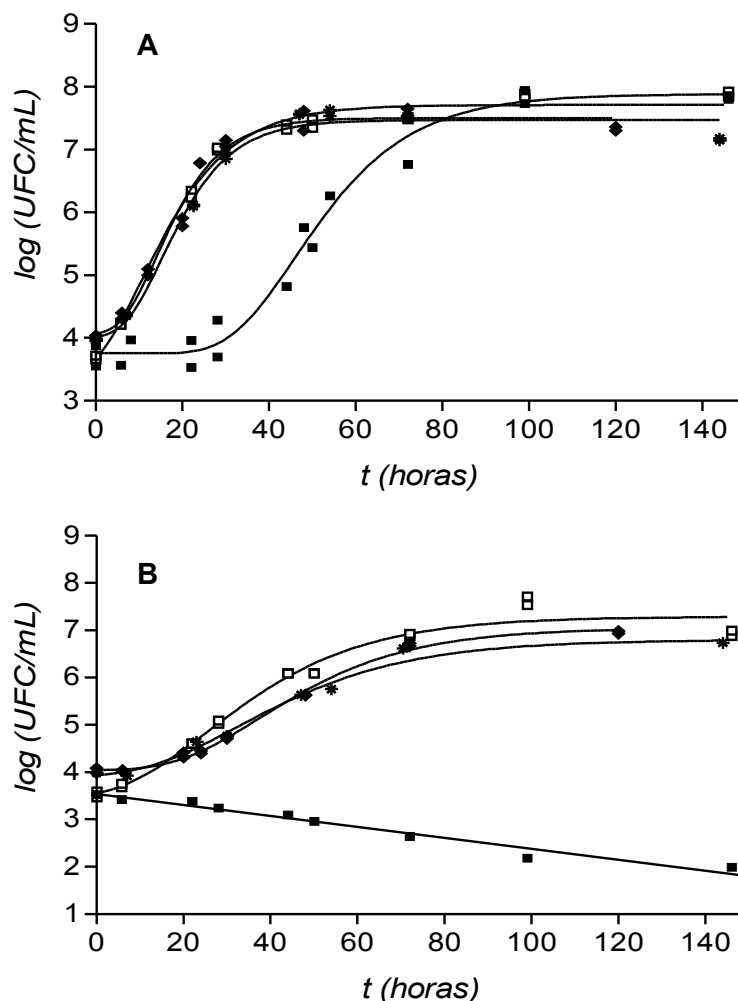


Figura 3.8 Crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud ajustado a diferentes valores de pH. UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL. Panel A: caldo de pH 4,5; panel B: caldo de pH 3,0. ◆ películas pH 3,0 10; ▲ películas pH 4,5 15; ■ películas 6,5 30; ○ películas 6,5 SS. — Ajuste de la ecuación de Gompertz o ajuste lineal.

Como puede apreciarse en la Tabla 3.3, el nivel de KS en las películas 4,5 15 y 3,0 10 fue notablemente menor que lo esperado. Esta disminución en la carga de sorbato, correspondería a una destrucción del preservador durante la fabricación de las películas. La velocidad de destrucción del ácido sórbico ha sido estudiada a distinto pHs y composiciones del medio (Gerschenson y Campos, 1995; Campos, 1995) y se estableció que dicha velocidad aumenta con la disminución del pH del medio. Se ha sugerido que solamente el ácido no disociado es susceptible a la degradación y que la forma ionizada es degradada a un nivel despreciable. Ello contribuye a que, a pesar de observarse un alto porcentaje de liberación en estos sistemas (92 - 98%), la cantidad de sorbato

liberada al medio proporcione un nivel de antimicrobiano muy por debajo de la MCI para la levadura estudiada.

ii) Disminución del contenido de sorbato de potasio

La Figura 3.9 paneles A y B muestra los datos experimentales y las curvas modeladas del crecimiento de *Z.bailii* en caldo Sabouraud a pH 4,5 y 3,0 en presencia de películas comestibles con contenido variable de KS. En este ensayo el pH original de las películas no fue modificado. En la Figura 3.7, se resumen los parámetros de crecimiento de la levadura según los resultados del ajuste de los datos con la ecuación de Gompertz o ajuste lineal (en el caso de observarse muerte de microorganismos).

Puede apreciarse que, a medida que aumenta la cantidad de KS incorporado a las películas y, por ende, liberado al medio de cultivo, se incrementa la inhibición del desarrollo de la levadura. A medida que aumenta el nivel de sorbato en el caldo receptor, este nivel se acerca a los valores de MCI para cada pH estudiado, y ejerce por lo tanto mayor efecto antimicrobiano. En estos sistemas las concentraciones de sorbato en los caldos (condición de equilibrio) fueron las siguientes: 0,46 g/L y 0,48 g/L para la película de 6,5 30; 0,26 g/L y 0,27 g/L para la película 6,5 20; y 0,13 g/L y 0,14 g/L para la película 6,5 10, para los caldos a pH 4,5 y 3,0 respectivamente. Estas cantidades determinaron elevadas fracciones de KS liberado, registrándose valores entre 0,94 y 0,99.

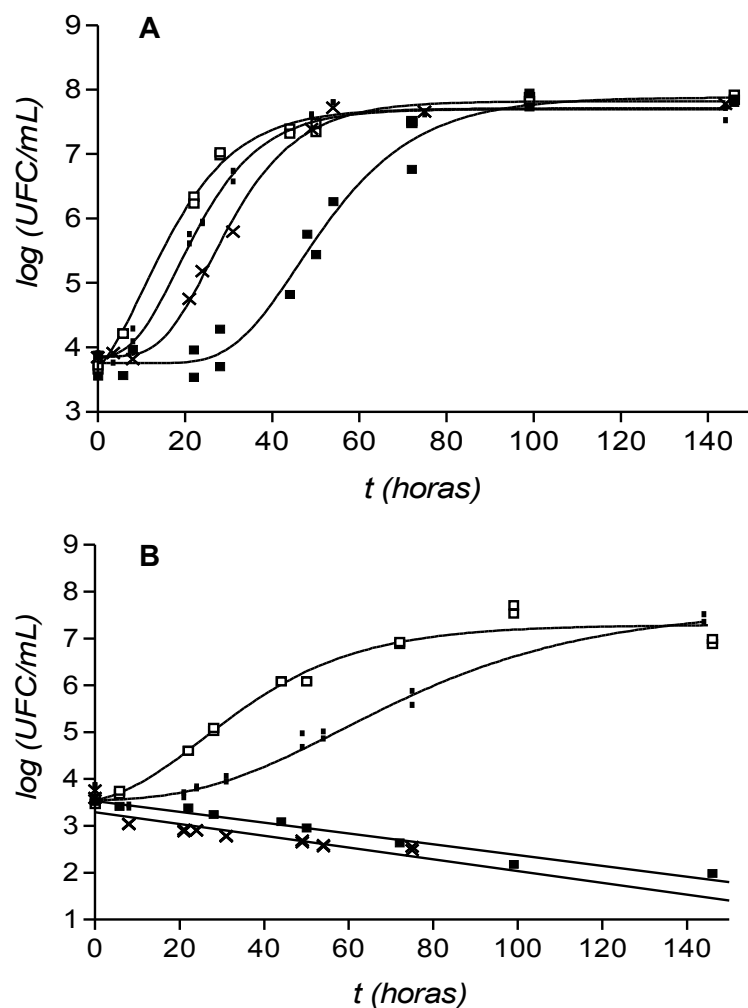


Figura 3.8 Crecimiento de *Z.bailii* en caldo Saboureaud ajustado a diferentes valores de pH. UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mL. Panel A: caldo de pH 4,5; panel B: caldo de pH 3,0. □ películas pH 6,5 10; § películas pH 6,5 20; ■ películas 6,5 30; □ películas 6,5 SS. — Ajuste de la ecuación de Gompertz o ajuste lineal.

En el panel A de la Figura 3.7 puede apreciarse que la velocidad de crecimiento a pH 4,5 de los sistemas conteniendo películas con valores de sorbato y/o pH reducidos, fueron similares a excepción del sistema 6,5 30. En este último caso, el parámetro μ fue significativamente menor. Los tiempos lag registrados a este pH (panel B) fueron incrementándose entre 8 y 30 horas, a medida que aumentaba la cantidad de sorbato incorporado a las películas 6,5 10, 6,5 20 y 6,5 30. Por el contrario, una reducción del pH y del contenido de sorbato de las coberturas (3,0 10 y 4,5 15), resultó en períodos lag de 3 a 6 horas, aproximadamente.

La Figura 3.7 panel A, también muestra que la velocidad de crecimiento se vio reducida en todos los sistemas cuando el pH del medio receptor fue 3,0. En general, el

cambio en el pH y cantidad de sorbato de las películas no modificó este parámetro, incluso en comparación con los sistemas controles (sin KS). Sin embargo, se observó un cambio significativo cuando las películas fueron fabricadas a pH 6,5: desde muerte de microorganismos (películas 6,5 30 y 6,5 20) a crecimiento de las levaduras a distintas velocidades (películas 6,5 10 y 6,5 SS).

El tiempo lag cuando el pH del medio receptor era 3,0 (Figura 3.7 panel B), dependió de la composición de las películas, siendo en general, mayor a medida de aumentaba la cantidad de antimicrobiano en la formulación; a excepción de las películas 4,5 15 y 4,5 SS, las cuales no presentaron diferencias en este parámetro.

Las máximas poblaciones alcanzadas en las curvas de crecimiento fueron semejantes en prácticamente todos los casos estudiados (Figura 3.7 panel C). Solamente se observó una leve reducción de la población en la fase estacionaria en los sistemas conteniendo películas 3,0 10 y 4,5 15 cuando el pH del medio receptor era 3,0.

De acuerdo a estos resultados, cabe destacar que los sistemas más efectivos para prevenir el crecimiento de *Z.bailii*, tanto a pH del medio receptor 4,5 como 3,0, fueron aquellos que contenían películas de pH original y con mayor contenido de sorbato (6,5 30 y 6,5 20). Como se mencionó previamente, estas tendencias se explicarían considerando la cantidad de antimicrobiano liberado al medio, la MCI correspondiente en cada caso y la estabilidad del antimicrobiano a pHs menos ácidos.

3.3.2.2 Efecto de la incorporación de aceite de soja

La efectividad para controlar el desarrollo de *Z.bailii* del KS contenido en películas elaboradas a partir de una emulsión o/w y liberado a un caldo Sabouraud de pH 4,5 o 3,0, puede observarse en la Figura 3.10. Asimismo, se incluyen en dicha figura los modelados según la ecuación de Gompertz o ajuste lineal. A fines comparativos, se incorporaron, las curvas de crecimiento obtenidas en los mismos medios en presencia de películas fabricadas con la misma técnica (método 2) pero ausencia de lípidos (M2 KS y M2 SS). En ambos casos, las películas conteniendo antimicrobiano fueron elaboradas con una concentración inicial de sorbato de 3 g/kg y pH inicial de aproximadamente 6,5. La cantidad de antimicrobiano determinada en las películas con aceite fue de 33,88 g/kg.

Como puede observarse en la Figura 3.10, panel A, cuando los sorbatos provenían de películas conteniendo aceite, la fase lag disminuyó a, aproximadamente, 15 horas cuando el pH del medio receptor era de 4,5. La fase lag de crecimiento de la levadura se extendió hasta, aproximadamente 30 horas en el caso de los sorbatos liberados a

partir de películas obtenidas en ausencia de lípido (M2 KS). La fase estacionaria se alcanzó a las 72 horas, aproximadamente, cuando las películas evaluadas fueron las que contenían aceite. En cambio, para la película M2 KS la fase estacionaria de crecimiento se observó a partir de las 96 horas. A pH 4,5, los sistemas controles libres de preservador, no inhibieron el crecimiento (Figura 3.10, panel A) y la fase estacionaria se alcanzó, aproximadamente, luego de 48 horas.

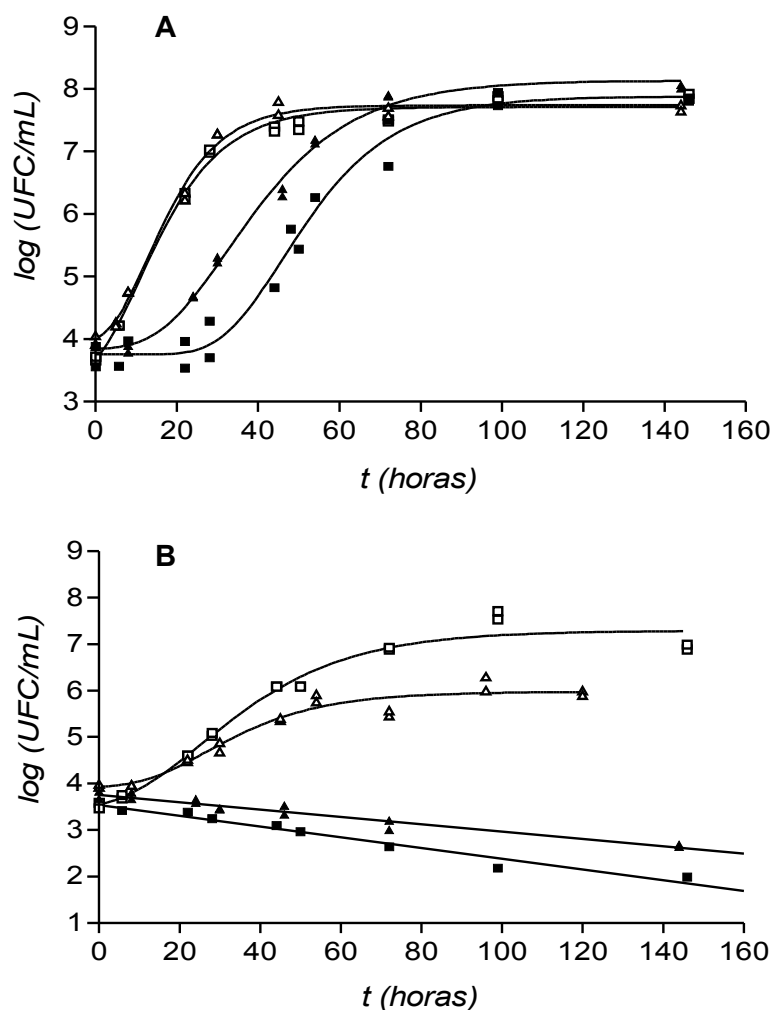


Figura 3.10 Crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud ajustado a diferentes valores de pH. Panel A: pH 4,5; panel B: pH 3,0. ▲ caldo con películas conteniendo aceite; ■ caldo con películas M2. Símbolos llenos: películas con KS. Símbolos huecos: películas sin KS — Ajuste de la ecuación de Gompertz o ajuste lineal.

Anteriormente se mencionó que el nivel de antimicrobiano presente en caldo de pH 4,5 y proveniente de las películas, estaría por debajo del nivel inhibitorio mínimo necesario para evitar el desarrollo de la levadura en este medio, permitiendo entonces su crecimiento. El nivel de sorbato determinado en el caldo cuando se estudiaron

películas formuladas con lípido fue de 0,44 g/L y 0,45 g/L a pH 4,5 y 3,0 respectivamente, valores que no difieren significativamente de los hallados para el caso de las películas M2 KS. Por lo tanto, la reducción observada en la capacidad inhibitoria de los sorbatos liberados en presencia de aceite de soja, señalaría un efecto antagónico entre estos dos componentes.

Castro y col. (2003) observaron que el reparto de los sorbatos entre la fase acuosa y la oleosa de sistemas emulsionados disminuía su efecto antimicrobiano. De acuerdo a ello, se puede concluir que el aceite de las películas, una vez incorporado al sistema receptor, afectaría la eficiencia de los sorbatos en nuestras experiencias. Cabe aclarar que estas películas en contacto con el medio acuoso y bajo agitación constante, no permanecieron íntegras durante el ensayo, y esta pérdida de estructura habría permitido que el aceite pase al caldo receptor.

Ambas formulaciones conteniendo sorbato provocaron una disminución del crecimiento de *Z.bailii* de alrededor de 2 ciclos logarítmicos, luego de 140 horas de incubación cuando el pH del medio receptor fue 3,0 (Figura 3.10 panel B). Las películas libres de antimicrobiano, por el contrario, no mostraron efecto inhibitorio permitiendo el desarrollo de la levadura luego de una fase lag de alrededor de 12 horas. La velocidad de crecimiento fue menor que la registrada en el caldo a pH 4,5.

3.3.2.3 Efecto del entrecruzamiento del almidón

La efectividad para controlar el desarrollo de la levadura *Z.bailii*, del sorbato de potasio contenido en películas elaboradas a partir de almidón entrecruzado (C1 KS) y liberado a un medio líquido, puede observarse en la Figura 3.11, paneles A y B. A fines comparativos, en la misma figura se aprecia el desempeño de los sorbatos incorporados a las películas obtenidas con el almidón nativo a través del método de fabricación 2 (M2 KS). Las curvas obtenidas por el ajuste de Gompertz o ajuste lineal, también fueron incluidas en esta figura. En ambos casos, las películas fueron elaboradas con una concentración inicial de sorbato de 3 g/kg. El valor de concentración de sorbato en el caso de la película C1 KS fue de 31,60 g/kg.

Como puede observarse, la efectividad de los sorbatos fue similar, ya sea que estuviese soportado en películas obtenidas con el almidón entrecruzado (C1 KS) o con el almidón nativo (M2 KS).

En caldo de pH 4,5 la fase lag de crecimiento de la levadura se extendió hasta aproximadamente 30 horas y la fase estacionaria de crecimiento, se observó a partir de las 96 horas. Los sistemas controles libres de preservador, mostraron un comportamiento similar para ambas formulaciones ensayadas (Figura 3.11 panel A). La

levadura pudo desarrollarse desde el inicio de la incubación a una velocidad mayor que en el caso de las películas portadoras del antimicrobiano y la fase estacionaria se alcanzó, aproximadamente, luego de 30 horas.

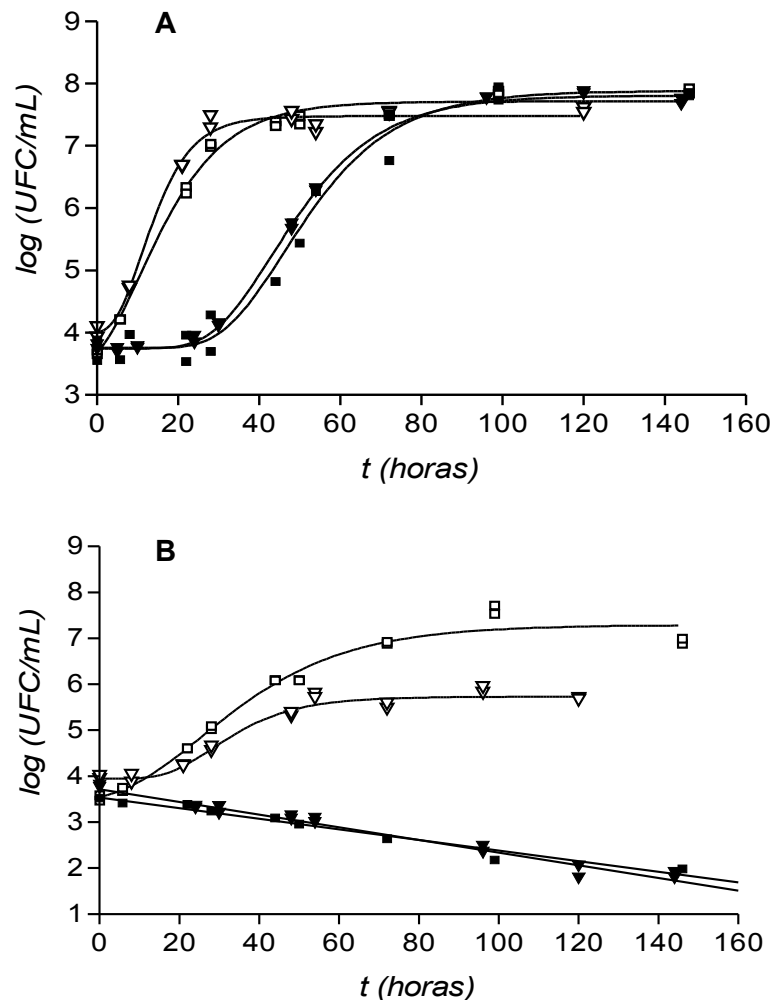


Figura 3.11 Crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud ajustado a diferentes valores de pH. Panel A: pH 4,5; panel B: pH 3,0. ▼ caldo con películas C1; ■ caldo con películas M2. Símbolos llenos: películas con KS. Símbolos huecos: películas sin KS. — Ajuste de la ecuación de Gompertz o ajuste lineal.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del microorganismo en un caldo de pH 4,5, observado en este ensayo, puede explicarse teniendo en cuenta que la cantidad de antimicrobiano liberado al medio fue de 0,46 g/L (fracción liberada $\cong 1$), lo que determinaría una concentración de sorbato inferior a la MCI necesaria para inhibir el crecimiento de la levadura en este medio.

En la Figura 3.11 panel B, se muestra el desempeño de los sorbatos liberados a un medio de pH 3,0. Para las películas portadoras del antimicrobiano, se observó un decrecimiento de la población de alrededor de 2 ciclos logarítmicos luego de 140 horas de incubación. En este caso, la cantidad de sorbato presente en el medio fue 0,45 g/L (fracción liberada $\cong 1$) que supera a la MCI para este caldo y valor de pH (0,300 g/L, Gliemmo y col., 2004), por lo que el microorganismo ve impedido su desarrollo. Contrariamente, cuando películas sin KS fueron sumergidas en caldo Sabouraud a pH 3,0, no se observó inhibición del crecimiento (Figura 3.11, panel B) sino que luego de una fase lag de, aproximadamente, 16 horas, la levadura creció a una velocidad menor que la registrada a pH 4,5, alcanzando un nivel poblacional más bajo en la fase estacionaria ($\log \text{UFC/mL} \cong 6,9$).

De acuerdo a estos resultados, la actividad del preservador resultó similar cuando se usaron películas constituidas con almidón entrecruzado o nativo.

A continuación se resumen los parámetros obtenidos para las películas elaboradas con aceite, con almidón entrecruzado y con almidón nativo, a partir del modelado de las curvas de crecimiento con la ecuación de Gompertz, o el ajuste lineal en el caso de registrarse muerte de microorganismos (Figura 3.12).

Se observó que, en general, el comportamiento de los sorbatos contenidos en las películas estudiadas fue similar tanto a pH del medio receptor 4,5 o 3,0: las velocidades de crecimiento específico fueron mayores a pH 4,5 que a 3,0. La presencia de sorbato en las películas provocó el enlentecimiento del desarrollo de *Z.bailii* en pH 4,5 y la muerte de la levadura a pH 3,0 (Figura 3.12 panel A).

Las películas conteniendo aceite y KS, determinaron una disminución de la fase lag a pH 4,5, en comparación con los caldos en contacto con las películas C1 KS y M2 KS, posiblemente debido a que el reparto del KS entre las fases oleosa y acuosa disminuiría su efectividad. En los casos donde se registró crecimiento de la levadura, la máxima población de células fue, en general, similar para todos los sistemas (Paneles B y C).

Las películas libres de KS presentaron desarrollos más rápidos de *Z.bailii* a pH 4,5 que a pH 3,0, indicando la existencia de un efecto inhibitor *per se* del pH sobre el crecimiento de la levadura.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que los cambios introducidos en las formulaciones de las películas (agregado de aceite y modificación del almidón), no introdujeron un beneficio adicional en cuanto a la inhibición de *Z.bailii* inoculada en medios líquidos a pH 4,5 o 3,0.

Se desea señalar que la fracción de antimicrobiano liberado al caldo Sabouraud, fue en todos los casos elevada, indicando un importante grado de transferencia del preservador desde la matriz amilácea a un medio acuoso.

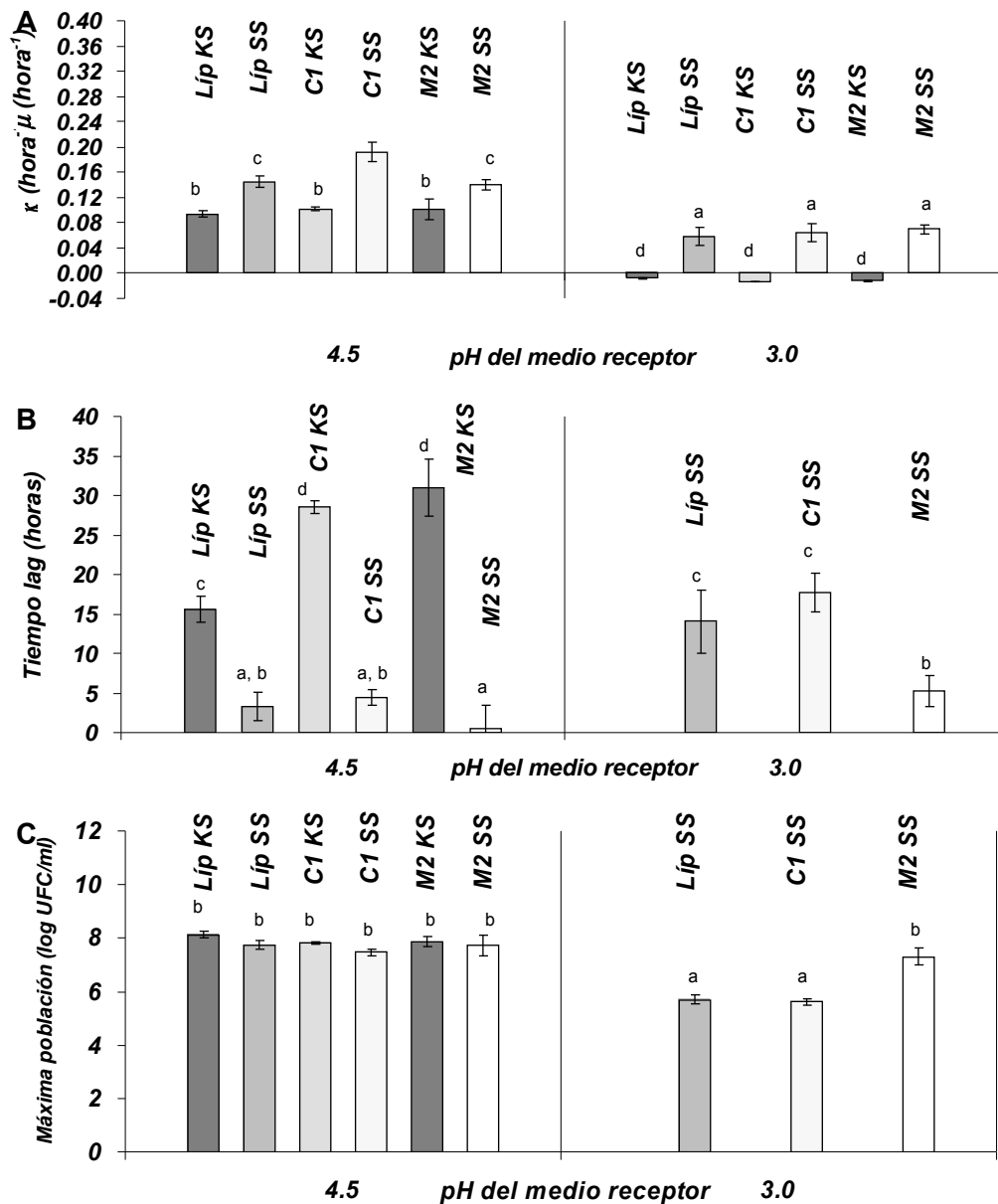


Figura 3.12 Parámetros de crecimiento obtenidos con la ecuación de Gompertz y ajuste lineal de las curvas de crecimiento de *Z. bailii* en caldos Sabouraud a distintos pHs y conteniendo películas comestibles.

Panel A: velocidad de crecimiento específica; Panel B: tiempo lag; Panel C: máxima población de células.

Barras con igual letra no difieren significativamente (α : 0,05).

3.3.3 **Actividad antimicrobiana del sorbato de potasio contenido en películas empleadas como barrera a la contaminación por *Z.bailii* en un alimento modelo semisólido**

En este apartado se describirán cualitativamente las curvas de crecimiento obtenidas en los ensayos de barrera antimicrobiana. Asimismo, se indicará la cantidad de KS liberado desde las películas hacia el agar para cada caso estudiado, a fin de estimar la fracción de antimicrobiano transferido al medio semisólido.

3.3.3.1 **Efecto del cambio de pH y del contenido de sorbato de potasio**

i) Disminución del pH

La Figura 3.13 muestra el desempeño del KS incorporado a las películas 3,0 10 y 6,5 10, sobre el desarrollo de *Z.bailii* inoculada en la superficie de discos de estas películas.

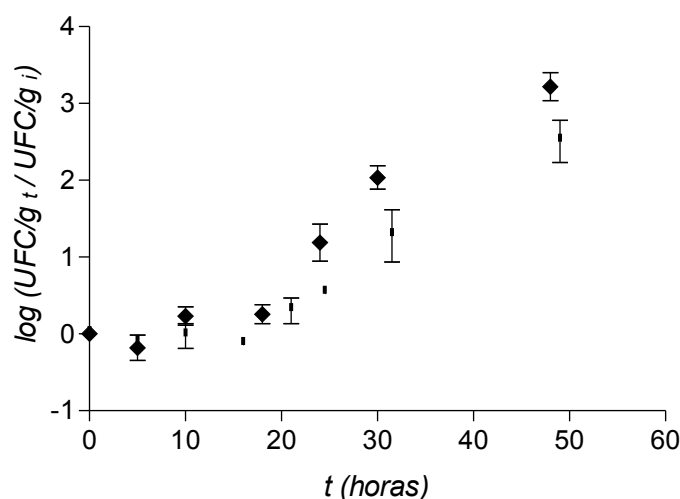


Figura 3.13 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t.

UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0,98 y pH 4,5. ♦ película 3,0 10; ▲ película 6,5 10.

Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

Puede observarse que ambas películas retardaron el crecimiento de la levadura entre 10 - 16 horas, permitiendo luego el desarrollo de *Z.bailii*. El recuento de viables se incremento en 3 unidades log para la película 3,0 10 y en 2,5 unidades log para la película 6,5 10, luego de 48 horas de incubación. Esta diferencia en el crecimiento puede atribuirse a la menor carga de KS contenida en la película de menor pH (Tabla 3.3). La cantidad de antimicrobiano transferida al agar determinó una concentración de 0,015 g /kg y de 0,035 g/kg para las películas 3,0 10 y 6,5 10 respectivamente. Estas

cantidades representan una tasa de transferencia entre el 86 y 90% del KS inicialmente contenido en las coberturas. Este hecho estaría relacionado con el desarrollo de *Z.bailii* observado en la superficie del disco de película.

En la Figura 3.14 se muestran los resultados obtenidos para las películas elaboradas a pH reducido y conteniendo KS. Se incluyen también, a fines comparativos, la película fabricada a pH sin modificar, con y sin KS.

Puede apreciarse que la película 6,5 30 ejerció la mayor inhibición sobre el crecimiento de la levadura, no observándose desarrollo de *Z.bailii* hasta las 48 horas. La disminución del pH, a 4,5 y 3,0 en paralelo con una reducción del contenido de KS, produjeron un comportamiento similar: retardo en el crecimiento de hasta 10 horas y luego un aumento en el nivel poblacional de, aproximadamente, 3 ciclos logarítmicos.

Ya que las películas controles (sin sorbato), en todos los casos, no inhibieron el crecimiento de la levadura, se muestran en la Figura 3.14 solamente los resultados obtenidos con la película 6,5 SS. En estos casos, el retardo en el desarrollo fue de aproximadamente 5 horas. Luego de este período, *Z.bailii* creció a mayor velocidad hasta alcanzar un incremento de 3 ciclos log a las 48 horas de incubación.

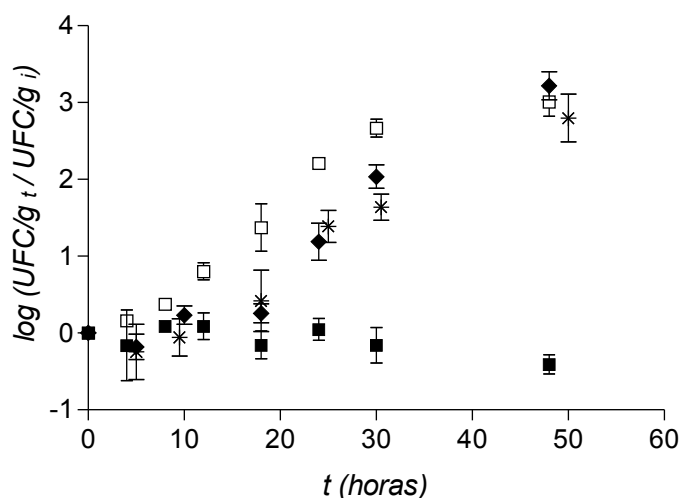


Figura 3.14 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t. UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0,98 y pH 4,5. ♦ película 3,0 10; □ película 4,5 15; ■ película 6,5 30; □ película 6,5 SS. Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

Las concentraciones de KS halladas en los geles fueron las siguientes: 0,015 g/kg, 0,016 g/kg y 0,108 g/kg; y las fracciones de KS liberado fueron de 0,90, 0,83 y 0,86 para los sistemas con película 3,0 10, 4,5 15 y 6,5 30 respectivamente.

i) Disminución del contenido de sorbato de potasio

El efecto de la concentración de KS en las películas es mostrado en la Figura 3.15.

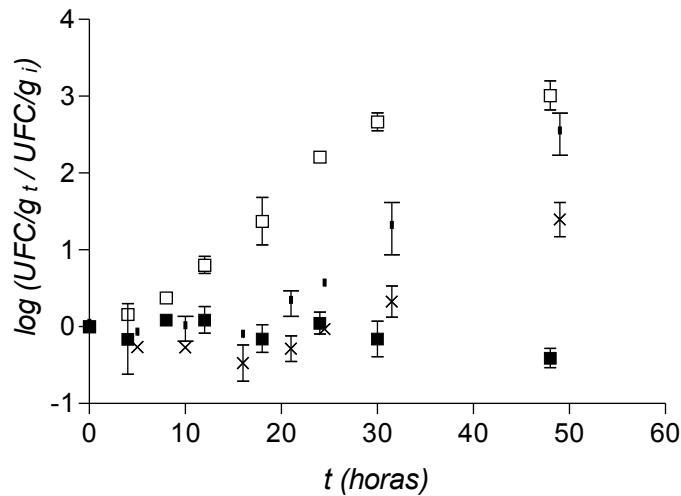


Figura 3.15 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t. UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Crecimiento de *Z. bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0.98 y pH 4,5. x película 6,5 10; ■ película 6,5 20; □ película 6,5 30; ● película 6,5 SS. Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

La cantidad de sorbato soportada en las películas tuvo un efecto significativo en su acción antimicrobiana. A medida que disminuye el contenido del preservador, disminuye el retardo en el crecimiento superficial siendo de, aproximadamente, 48 horas para la película 6,5 30, de 24 horas para 6,5 20 y de 16 horas para 6,5 10. El nivel poblacional observado luego de 48 horas de incubación también dependió del contenido de sorbato de las películas, incrementándose al disminuir la concentración del antimicrobiano: 1,3 ciclos log para 6,5 10; 2,5 ciclos log para 6,5 20 y 3 ciclos log para 6,5 SS.

Las fracciones de KS transferidas al agar fueron: 0,85, 0,91 y 0,86, lo que corresponde a concentraciones de KS en el agar de 0,035 g/kg, 0,080 g/kg y 0,108 para las películas 6,5 10, 6,5 20 y 6,5 30 respectivamente.

El hecho de observar crecimiento de la levadura, podría atribuirse a la parcial migración del sorbato y/o a la insuficiente cantidad del mismo en superficie.

3.3.3.2 Efecto de la incorporación de aceite de soja

La Figura 3.16 muestra el comportamiento de las películas elaboradas en presencia y ausencia de aceite de soja, con y sin KS.

Se observó que el crecimiento fue retrasado hasta las 25 horas, aproximadamente, cuando el lípido y el KS (Líp KS) formaban parte de la formulación de las películas. Este tiempo es menor que el observado para las películas sin aceite. Por otro lado, el crecimiento de la levadura fue 1 ciclo logarítmico superior al observado para la película M2 KS, luego de 48 horas de incubación.

Por el contrario, las películas controles sin sorbato de ambas formulaciones (Líp SS y M2 SS), no provocaron inhibición del desarrollo de *Z.bailii*, incrementándose el nivel poblacional en 3 ciclos logarítmicos al cabo de 48 horas de incubación.

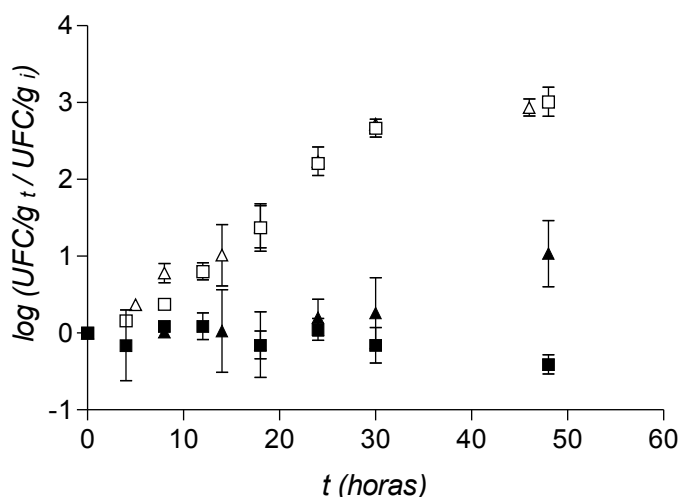


Figura 3.16 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t. UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0.98 y pH 4,5. ▲ películas Líp KS; △ películas Líp SS; ■ película M2 KS; □ película M2 SS. Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

En estos sistemas, los niveles de antimicrobiano registrados en los agares fueron de 0,126 g/kg y de 0,108 g/kg para las películas Líp KS y M2 KS. La fracción de antimicrobiano liberado en cada caso fue de 0,90 y 0,87.

3.3.3.3 Efecto del entrecruzamiento del almidón

Cuando las películas estuvieron en contacto con un producto de alta a_w y acidificado (agar Sabouraud con a_w deprimido a 0,98 por adición de glucosa y pH ajustado a 4,5 con ácido cítrico, Figura 3.17), se observó que la población de *Z.bailii*

permanecía aproximadamente constante para los sistemas cubiertos con películas constituidas con almidón nativo o modificado y soportando KS, luego de 48 horas de incubación.

Sin embargo, el alimento modelo cubierto con película libre de preservador sufrió un incremento de 3 ciclos logarítmicos en el recuento de la levadura luego de 48 horas de almacenamiento.

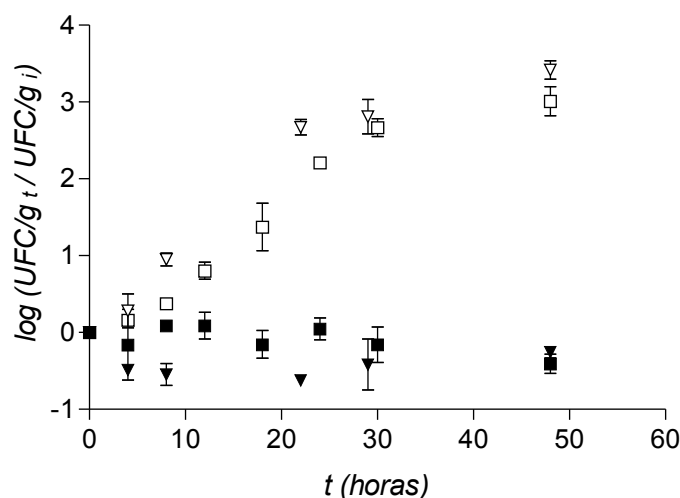


Figura 3.17 Películas comestibles como barrera a la contaminación externa. UFC/g t: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo t. UFC/g i: unidades formadoras de colonia por gramo a tiempo cero. Crecimiento de *Z.bailii* en la superficie de la película en contacto con un medio semisólido de a_w 0.98 y pH 4,5. ▼ películas C1 KS; ▽ películas C1 SS; ■ película M2 KS; □ película M2 SS. Las barras verticales representan el desvío estándar del promedio (n=3).

Para los sistemas cubiertos con la película C1 KS (contenido de KS: 34,24 g/kg) la cantidad de antimicrobiano liberado al agar determinó una concentración de 0,139 g/kg, lo cual se corresponde con una fracción estimada de KS liberado de 0,93.

3.3.4 Cambios en la formulación de películas comestibles. Su influencia en las propiedades físico-químicas

A continuación, se describirán las propiedades físicas y químicas de películas portadoras de KS y elaboradas, en un caso con aceite de soja (Líp KS) y en el otro con almidón entrecruzado (C1 KS). Se compararan dichas propiedades con las

correspondientes a las de películas portadoras de sorbato obtenidas con el método 2 de fabricación y con el almidón nativo (M2 KS).

3.3.4.1 Cristalinidad

La Figura 3.18 muestra los patrones de difracción de rayos X de las películas Líp KS, C1 KS y M2 KS.

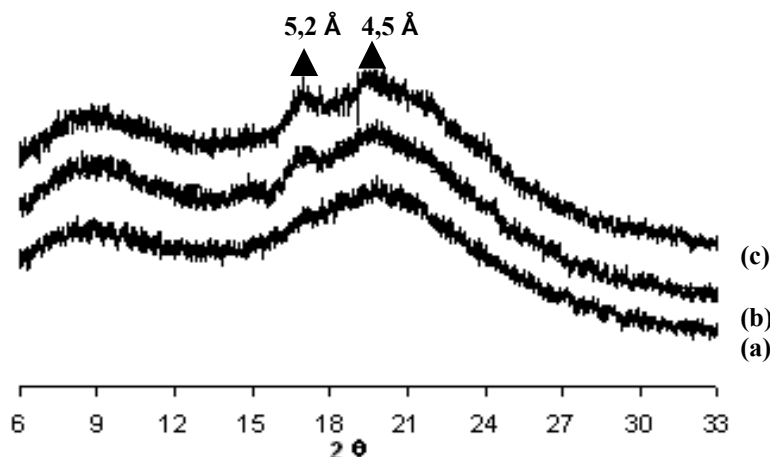


Figura 3.18 Patrón de difracción de rayos X de las películas (a): Líp KS, (b) M2 KS, (c) C1 KS.

Se encuentra reportado en bibliografía (Xie y col., 2005; Dumoulin y col., 1998) que un aumento en el grado de entrecruzamiento del almidón, provocaría una reducción en la cristalinidad debido a que los puntos de anclaje pueden limitar la movilidad de las cadenas y, consecuentemente, obstaculizar la formación de estructuras ordenadas (dobles hélices). Sin embargo, Del Ville y col. (2003) observaron que el proceso de fotocrosslinking al cual fueron sometidas películas a base de almidón de trigo, no previno totalmente la retrogradación y formación de zonas cristalinas. A su vez, Atichokudomchai y Varavinit (2002) reportaron que no hubo un aumento significativo en la cristalinidad ni en la entalpía de fusión, de muestras de almidón de mandioca nativo y entrecruzado con STMP. Finalmente, Le Tien y col. (2000) encontraron que el entrecruzamiento por calentamiento o por irradiación γ de películas a base de proteínas del suero láctico, generaba una estructura más ordenada y más estable, ya que observaron un aumento en los picos de difracción por rayos X. En nuestro caso, se observa un leve aumento de cristalinidad en las películas obtenidas con el almidón entrecruzado (fracción cristalina de 8,9) con respecto a las fabricadas con el almidón nativo (fracción cristalina de 8,4). Este resultado estaría vinculado al hecho que el agente entrecruzante consolida la disposición del gránulo de almidón, determinando una menor desorganización estructural del gel de partida (Hoseney, 1991).

Contrariamente, las películas elaboradas con aceite resultaron prácticamente amorfas (fracción cristalina de 2,6). Esto sería el resultado del proceso de elaboración, el cual involucra una etapa de homogenización de la emulsión mediante una intensa cizalla. Este proceso disminuye drásticamente la viscosidad del gel por ruptura de los gránulos gelatinizados, y esto determinaría una disminución del ordenamiento de las cadenas que se alcanza durante la retrogradación luego de dos semanas de la gelatinización. Por otro lado, el lípido puede actuar como agente plastificante bloqueando sitios de interacción entre cadenas por puente de hidrógeno, y por lo tanto impidiendo el ulterior ordenamiento intramolecular.

3.3.4.2 Propiedades sorcionales y de barrera

- **Humedad, solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua**

En la Tabla 3.4 se detallan el contenido de humedad, la solubilidad en agua y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas estudiadas.

Tabla 3.4 Humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas comestibles portadoras de KS

	Humedad (g / 100 g, b.s.)	% Solubilidad	PVA (30°C) (x10 ¹⁰ g / s m Pa)
Líp KS	36,99 ± 0,03 ^a	21,3 ± 9,9 ^b	20,6 ± 3,7 ^d
C1 KS	38,1 ± 2,8 ^a	26,4 ± 3,5 ^{b, c}	19,8 ± 3,7 ^d
M2 KS	41,7 ± 0,8	30,4 ± 1,85 ^c	19,1 ± 1,9 ^d

Se informan promedios e intervalos de confianza.

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (α : 0.05).

Las películas fabricadas con almidón nativo presentaron mayor contenido de humedad y solubilidad respecto a las obtenidas con el almidón modificado. Como la reacción propuesta para el entrecruzamiento con STMP involucra la formación de grupos ésteres entre un grupo fosfato del STMP y dos oxhidrilos del almidón polimérico (diéster fosfato), el agente de entrecruzamiento, covalentemente enlazado, refuerza la estructura tridimensional del almidón al mismo tiempo que disminuye el número de grupos -OH capaces de interaccionar con el agua, permitiendo controlar la sorción de humedad y reduciendo la solubilidad de las películas obtenidas. Además, como se dijo en la sección anterior, las películas C1 KS resultaron levemente más cristalinas y esta característica estructural está, generalmente, acompañada por una disminución del contenido de humedad.

Demirgöz y col. (2000) obtuvieron películas compuestas a base de almidón de maíz entrecruzado con STMP y acetato de celulosa, con reducida habilidad para la absorción de agua y menor velocidad de degradación en medio acuoso, como resultado del grado de entrecruzamiento. Del mismo modo, Seker y Hanna (2005), informaron que el índice de absorción de agua disminuía cuando extrudados de almidón de maíz era tratado con niveles crecientes de STMP.

Las películas conteniendo aceite, también mostraron humedad y solubilidad en agua reducidas respecto de la cobertura sin el agregado de lípido (M2 KS). Si bien el agregado del lípido provocó un importante efecto plastificante y, por lo tanto, una estructura más amorfa que la correspondiente a la película M2 KS (Figura 3.18), en este caso, la presencia del lípido reduciría la cantidad de puntos de interacción almidón-agua, provocando un descenso en el contenido de humedad global. Adicionalmente, la naturaleza hidrofóbica del aceite, provocó un descenso en la hidrofiliidad y, por lo tanto, en la solubilidad de estas películas en agua.

Numerosos estudios han revelado que la incorporación de lípidos a la formulación de películas hidrofílicas, mejoraron sus propiedades de barrera al vapor de agua (García y col., 2000; Kester y Fennema, 1989; Anker y col., 2001; Ayranci y Tunc, 2000). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 3.4), no se observaron diferencias significativas (α : 0,05) para las tres formulaciones estudiadas. En el caso de la película elaborada con aceite de soja, el aumento de la fracción amorfa, altamente permeable al vapor de agua, compensaría el efecto del aumento en el carácter hidrofóbico de las películas.

- ***Isoterma de sorción***

La figura 3.19 muestra la isoterma de sorción de agua de películas elaboradas con agregado de aceite y con almidón entrecruzado. A fines comparativos se incorporó a dicha figura la isoterma de la película M2 KS elaborada a través del método 2. Los datos de las isotermas se ajustaron con la ecuación de Oswin y los parámetros obtenidos, se resumen en la Tabla 3.5.

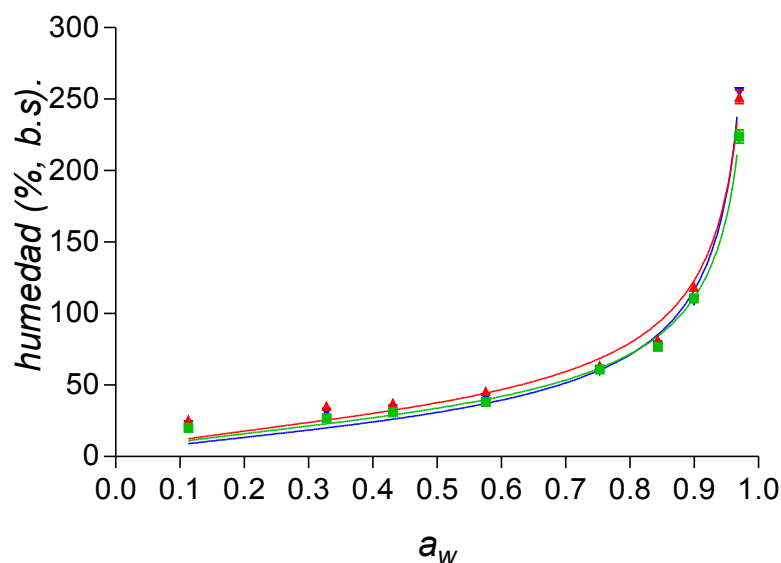


Figura 3.19 Isoterma de sorción, a 25°C, de películas comestibles conteniendo KS. ▽ Líp KS; ■ C1 KS; ▲ M2 KS. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos con la ecuación de Oswin.
 — Líp KS; — C1 KS; — M2 KS.

Tabla 3.5 Parámetros de ajuste de los datos sorcionales a 25°C, de películas comestibles conteniendo KS.

Formulación	Parámetros de Oswin		
	a (% b.s.)	n	R^2
Líp KS	$30,3 \pm 1,9^a$	$0,609 \pm 0,020$	0,9981
C1 KS	$33,5 \pm 1,2^a$	$0,540 \pm 0,017^b$	0,9838
M2 KS	$37,5 \pm 1,9$	$0,541 \pm 0,012^b$	0,9932

Se informan los mejores valores ajustados y sus errores estándar. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (α : 0.05). R^2 : bondad del ajuste.

Puede apreciarse, que el parámetro a es significativamente mayor para las películas M2 KS, mientras que el parámetro n es significativamente mayor para películas con lípido. Estas tendencias se visualizan en la Figura 3.19, donde se observa que las películas Líp KS y C1 KS, presentaron humedades menores en el rango de a_w entre 0,11 y 0,84. A partir de allí, el contenido de agua se incrementa mucho más rápidamente, equiparando a la película M2 KS.

3.3.4.3 Atributos de color

En la Tabla 3.6 se resumen los parámetros de la escala Hunter y el índice de amarillo (YI) para las películas estudiadas.

Tabla 3.6 Parámetro de color de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca

Formulación	a ¹	b ¹	L ¹	YI ²
Líp KS	-1,36 ± 0,05	5,8 ± 0,2 ^a	85,7 ± 0,4	11,6 ± 0,5 ^b
C1 KS	-1,43 ± 0,03	4,7 ± 0,1	86,5 ± 0,3	8,9 ± 0,2
M2 KS	-0,82 ± 0,03	5,6 ± 0,2 ^a	83,0 ± 0,5	11,9 ± 0,4 ^b

Se informan promedios e intervalos de confianza. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha:0.05$).

¹: parámetros de la escala Hunter

²YI: índice de amarillo.

Los resultados obtenidos indican que el empleo del almidón entrecruzado, resulta en películas con menor índice de amarillo (YI), menor valor del parámetro b positivo, indicadores de un menor pardeamiento sufrido por estos sistemas. La mayor luminosidad (parámetro L) de las películas entrecruzadas probablemente esté vinculada al menor pardeamiento así como a la menor ganancia de agua; ello determina la obtención de películas, apreciadas visualmente, como más transparentes.

En cuanto a las películas conteniendo aceite, presentaron similar índice de amarillo y parámetro b que las películas M2 KS, indicando que la incorporación de lípido no trae aparejado un cambio notable en la coloración.

3.3.4.4 Contenido de sorbato de potasio

La determinación de sorbato en las películas estudiadas, indicó que el cambio de formulación no produce diferencias significativas en cuanto a la concentración del preservador. Los resultados fueron: 33,88, 34,24 y 32,16 g/kg para las películas con Líp KS, C1 KS y M2 KS respectivamente.

3.3.5 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, en cuanto a la evaluación de la influencia del cambio de formulación de las películas en la actividad antimicrobiana del KS contenido en ellas y liberado a un medio acuoso, se puede destacar lo siguiente:

- ✓ La habilidad para controlar el desarrollo de *Z.bailii* en caldo Sabouraud de pH 4,5 y 3,0 de los sorbatos liberados a partir de películas comestibles, dependió del contenido de sorbato y del pH de las mismas. Ello está

vinculado a la cantidad de antimicrobiano liberado al caldo receptor y a su relación con la MCI necesaria para inhibir el desarrollo de la levadura.

- ✓ La incorporación de aceite de soja a la formulación de las películas, determinó una leve disminución en la efectividad del sorbato de potasio para inhibir el desarrollo de *Z.bailii* en un medio de pH 4,5. Este hecho estaría vinculado con el reparto del antimicrobiano entre la fase oleosa y la fase acuosa.
- ✓ La efectividad de los sorbatos soportados en películas elaboradas con almidón de mandioca entrecruzado fue similar a la observada para películas fabricadas con almidón nativo con igual nivel de preservador (30 g/Kg) y pH (6,5).

En relación a la efectividad de la película como barrera a la contaminación en un producto semisólido acidificado (pH 4,5) y de alta actividad de agua (a_w 0,98) se concluye que:

- ✓ El preservador estuvo disponible para controlar el crecimiento de la levadura y esta disponibilidad dependió de la formulación y pH de las películas. La efectividad antimicrobiana frente a *Z.bailii*, de los sorbatos soportados en películas de almidón de mandioca, es mayor a medida que aumenta el contenido de sorbato presente. La disminución de pH no compensa la reducción de la concentración del antimicrobiano.
- ✓ La presencia de lípido produce un retardo en el crecimiento de *Z.bailii* menor que la observada en ausencia del aceite en la película. Esto revela un efecto antagónico entre el KS y el aceite de soja cuando este último está presente en la formulación, ya que el sorbato estaría en parte comprometido en la fase oleosa.
- ✓ El entrecruzamiento del almidón con STMP al nivel ensayado, no afectó las propiedades de barrera a la contaminación de las películas de almidón de mandioca.

En cuanto al efecto de la formulación en las propiedades físico-químicas, se estableció que:

- ✓ La presencia de aceite o el uso de almidón entrecruzado con STMP en la elaboración de las películas, disminuyeron el contenido de humedad y la solubilidad en agua, pero no afectaron la PVA de las mismas, en comparación con las películas elaboradas en ausencia de lípido o con el almidón nativo.

CAP. 3 - Modificaciones en la formulación de películas comestibles. Su influencia en la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio y en las propiedades físico-químicas.

- ✓ El empleo de almidón entrecruzado produce películas con menor índice de amarillo y mayor luminosidad. Esta observación, junto con el hecho de tener similar actividad antimicrobiana con respecto a las películas elaboradas con almidón nativo, puede representar una ventaja desde el punto de vista de la aceptación del consumidor.
- ✓ El contenido de sorbato de potasio fue similar para las formulaciones estudiadas, indicando que ni el uso de almidón entrecruzado ni la incorporación de lípidos, afectan la estabilidad del preservador.

CAPÍTULO 4

APLICACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES A UN ALIMENTO VEGETAL PARA EXTENDER SU VIDA ÚTIL

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Preservación de productos frutihortícolas

Los cambios en los patrones de consumo de la vida moderna, es decir la mayor demanda de productos de características similares a las del producto fresco, inocuos, con menos aditivos y listos para preparar y servir, han determinado el desarrollo de nuevas técnicas de procesamiento de las frutas y verduras. Estas tecnologías disminuyen el deterioro de los vegetales, como se describe a continuación.

4.1.1.1 Productos de humedad intermedia

Uno de los desarrollos que se ha producido es el de los denominados alimentos de humedad intermedia (AHI). La estabilidad de estos alimentos, está basada, fundamentalmente, en la reducción de la actividad de agua (a_w : 0,60 - 0,90), como método de preservación primario, para prevenir el desarrollo de bacterias. Estos alimentos son de relativamente fácil elaboración y pueden, incluso, almacenarse sin refrigeración aparejando beneficiosos ahorros energéticos.

Sin embargo, son numerosas las restricciones para usar la disminución de a_w como único factor de prevención (Guilbert, 1988). Uno de ellos es el posible desarrollo de hongos y levaduras. Otro factor es la alta cantidad de aditivos que se requieren para los AHI, lo que puede acarrear problemas en la salud y conflictos legales.

Se debe recordar que la obtención de una textura adecuada que permita el consumo directo sin necesidad de rehidratación, implica el uso de altas concentraciones de humectantes y/o secado, así como la incorporación de preservadores que garanticen la estabilidad microbiológica. Por ello, existen también potenciales problemas sensoriales vinculados con alteraciones del sabor y olor "original" del producto, debido al empleo de altas concentraciones de humectantes (glucosa, sacarosa, sorbitol, glicerol, etc) o de sales (NaCl, sulfitos, nitritos, etc.) que hacen que el uso de este tipo de tecnologías encuentre limitaciones (Leistner, 1995).

Por lo tanto, renovados esfuerzos han sido realizados para mejorar la calidad de los AHI, como disminuir el nivel de aditivos o incrementar su a_w pero sin sacrificar la seguridad del producto aun en ausencia de refrigeración. Para ello se requiere la aplicación de métodos combinados de preservación o tecnologías de barreras.

4.1.1.2 **Preservación de frutihortícolas por métodos combinados**

Ha sido ampliamente reportado, que los procesos de conservación clásicos, basados en la aplicación de uno o dos factores de estrés en forma severa, garantizan inocuidad pero, en general, afectan negativamente la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos.

A fin de mantener la calidad microbiológica y organoléptica de los frutihortícolas y, al mismo tiempo, satisfacer el deseo de los consumidores por productos industrializados con cualidades parecidas a las de las materias primas, ha sido necesario desarrollar nuevas tecnologías que combinan distintos factores de conservación aplicados en dosis leves, los cuales pueden interaccionar en forma aditiva o sinérgica para controlar el deterioro del producto. Esta tecnología se conoce actualmente como tecnologías de barreras o tecnología de factores combinados. Con estas “barreras” se espera superar los mecanismos homeostáticos o de recuperación de los microorganismos frente a uno o varios factores de estrés (Leistner, 1995).

Como se mencionó, se debe emplear un número de tratamientos combinados para minimizar los cambios deteriorativos. Los tratamientos más comúnmente empleados son:

- **Tratamientos térmicos leves (escaldado):** es un tratamiento térmico entre 95° y 199°C que dura varios minutos, y se aplica clásicamente a sistemas tisulares como etapa previa a otras operaciones como la congelación, enlatado, liofilización o secado. Previa a la congelación se busca la destrucción de enzimas que afectan el color, sabor y contenido vitamínico. Hay dos enzimas ampliamente distribuidas en diversas plantas que son resistentes al calor: la peroxidasa y la catalasa. La medida de su ausencia de actividad se usa normalmente como indicador de la efectividad del escaldado. El escaldado puede hacerse con agua, vapor, aire caliente o microondas. Para frutas se usan a veces salmueras con sales de calcio que les proporcionan mayor dureza por la formación de pectatos de calcio. En la liofilización se acostumbra escaldar previamente el alimento para que, además de la inactivación enzimática y reducción de la carga microbiana descriptas, se facilite la rehidratación. Antes de enlatar se escalda para remover gases (especialmente oxígeno disuelto), inactivar enzimas, limpiar y aumentar la temperatura de los tejidos. Los inconvenientes que ocasiona el escaldado son los altos consumos de vapor (1 ton / ton de producto cuando se usa agua y entre 0,2 y 0,3 ton vapor / ton de producto), lo que implica un gran consumo energético (en algunos casos puede representar hasta el 40% del costo de la energía en un proceso), pérdida de material soluble de importancia nutricional como proteínas, azúcares, minerales y

vitaminas. Finalmente esta operación puede ser una fuente de polución por la generación de aguas residuales y olores (Zeuthen y Bøgh-Sørensen, 2003).

- **Descenso de la a_w por osmósis:** la adición de solutos al tejido vegetal es una de las técnicas empleadas para la reducción de la actividad acuosa. La impregnación de solutos puede ser llevada a cabo por infusión húmeda o seca. La infusión húmeda consiste en sumergir las piezas de alimento en una solución acuosa de bajo a_w mientras que la infusión seca involucra el mezclado directo de las piezas y los solutos. Cuando un producto sólido rico en agua, como frutas y vegetales, es sometidos a infusión se generan los siguientes flujos: flujo de agua desde el interior del tejido al medio, flujo de solutos desde el medio al producto y un flujo de los solutos propios del producto hacia el medio. Este proceso es denominado deshidratación osmótica y permite la infusión de no solamente el soluto usado para controlar la a_w , sino también de cantidades deseadas de agentes antimicrobianos, preservadores del pardeamiento, y cualquier otro soluto para mejorar la calidad sensorial y nutricional. Controlando estos intercambios es posible conseguir diferentes combinaciones de pérdida de agua y ganancia de sólidos. Con esta metodología también es factible incrementar la estabilidad de pigmentos, exaltar el flavor natural, lograr una mejor textura y enriquecer el producto (Leistner y Gorris, 1995).

- **Descenso del pH:** se trata de un factor básico que afecta la conformación de proteínas, el camino de síntesis enzimática y los productos finales del metabolismo. El pH afecta (i) el metabolismo energético microbiano involucrando la creación de gradientes de iones hidrógeno a través de la membrana, y (ii) la actividad de enzimas microbianas y la estabilidad de macromoléculas celulares. La efectividad de la acidificación depende en gran manera del tipo de ácido utilizado. Los ácidos minerales son efectivos en relación directa al pH, mientras que la actividad inhibitoria de los ácidos débiles (por ejemplo: benzoico, sórbico y propiónico) está potenciada por la molécula disociada (anión) capaz de tener efectos inhibitorios específicos en el metabolismo celular. El efecto de estos ácidos en los microorganismos depende de su constante de disociación y de la habilidad de la forma no disociada para penetrar la membrana citoplasmática.

La mayor parte de los microorganismos, principalmente bacterias, se multiplican mejor a valores de pH entre 6,6 y 7,5. Los alimentos de pH inferior a 3,5 (bebidas no alcohólicas, vinagre, vino) son alterados principalmente por mohos y levaduras, las cuales son más tolerantes pudiendo desarrollarse en los rangos de pH entre 1,5 - 11 y 1,5 - 8 respectivamente.

Es posible, en algunos alimentos, disminuir su pH para inhibir o destruir bacterias patógenas, pero la reducción del mismo hasta valores que impidan el desarrollo de hongos y levaduras no es factible debido a la alteración sensorial (sabor y consistencia) importante que se produciría en el producto.

- **Antimicrobianos:** pueden ser efectivos en la conservación de alimentos por controlar el crecimiento global de los microorganismos o, directamente, por destruir todos o parte de los mismos. El efecto bacteriostático o letal, dependerá de la reversibilidad del modo de acción del antimicrobiano, es decir de la habilidad del microorganismo de sobreponerse a su modo de acción. Generalmente, el accionar del preservador cae en una de tres categorías: reacción con la membrana celular causando permeabilidad incrementada y pérdida de constituyentes celulares, inactivación de enzimas esenciales, destrucción o inactivación funcional de material genético (Branen, 1993). Actualmente, alrededor de 30 compuestos diferentes pueden ser usados legalmente como antimicrobianos. Su selección y efectividad dependerá de: su espectro de acción, sus propiedades químicas, composición y cualidades del alimento en cuestión, de el / los sistema / s de preservación, presencia de otras sustancias, tipo y cantidad de microorganismos que se desea inhibir, de su toxicidad y costo.

Por supuesto, es posible combinar varios de los factores mencionados con las nuevas técnicas emergentes de preservación como atmósferas modificadas, aplicación de pulsos de luz de alta intensidad, etc.

4.1.1.3 **Productos mínimamente procesados**

Como respuesta a la demanda de alimentos listos para utilizar por parte de los consumidores, han surgido los denominados productos frutihortícolas mínimamente procesados. Estos alimentos pueden definirse como aquellos que han sido sometidos a operaciones tales como lavado, clasificación, cortado, pelado, rebanado, descorazonado, etc., las cuales no afectan extensivamente la cualidad de “fresco” del producto (Wong y col., 1994). El tejido vegetal permanece fisiológica y biológicamente activo (respira) y sus procesos e interacciones celulares se ven alterados en respuesta a los daños sufridos durante las operaciones.

Por sus características, los alimentos mínimamente procesados son muy perecederos y requieren de la aplicación de algunos de los factores en combinación mencionados, o bien, necesariamente, ser almacenados a baja temperatura para su adecuada conservación.

El procesado de los alimentos vegetales causa disrupción del tejido celular y colapso de las membranas, hechos que conducen a eventos tales como pérdida de iones y otros componentes, alteración del potencial de membrana y detrimento del turgor.

- *Deterioro y colapso causado por acción enzimática:* el corte de frutas y vegetales destruye la integridad de los tejidos celulares y promueve la liberación de enzimas endógenas y sustratos. Ejemplo de ello son: la formación de melanina por interacción de la enzima polifenoloxidasas con su sustrato (compuestos fenólicos y oxígeno) causando pardeamiento enzimático. Esta enzima cataliza reacciones oxidativas generando *o*-quinonas, las cuales interactúan para formar compuestos pardos poliméricos. Otro caso es la depolimerización de pectinas por acción de poligalacturonasa y liasa péctica, causando degradación de las paredes celulares. También es bien conocido el daño causado a la membrana lipídica por lipasas y lipooxigenasas, que genera colapso tisular.

- *Formación de metabolitos secundarios:* además de la incrementada acción enzimática, el corte del tejido puede inducir a la acumulación de metabolitos inusuales. El ejemplo más conocido es la acumulación de glicoalcaloides en la papa. Por su parte, la batata produce compuestos polifenólicos luego del daño tisular.

- *Incrementada producción de etileno:* el corte estimula la biogénesis del etileno, lo cual afecta la expansión celular, abscisión de la hoja y maduración de la fruta. El etileno es causado por la incrementada formación del ácido 1-aminociclopropan-1-carboxílico y la subsecuente conversión de este ácido a etileno. Los cambios fisiológicos inducidos por la producción excesiva de etileno son: permeabilidad incrementada de la célula, aumento de la senescencia, actividad respiratoria y enzimática.

- *Incrementada respiración:* la velocidad de respiración se mide como cantidad de CO₂ producido y es el resultado de muchos eventos bioquímicos que conllevan a cambios de color, flavor, textura y calidad nutricional. Estos cambios incluyen: degradación de carbohidratos, activación de la glicólisis y camino de la pentosa fosfato, mayor actividad mitocondrial, enzimática, aumento de la síntesis de proteínas.

- *Cambios en la microflora:* el jugo exudado en el corte de tejidos, constituye un medio de crecimiento favorable para microorganismos. El manipuleo y las condiciones de almacenamiento, también pueden modificar la microflora incrementando el riesgo para la salud. En vegetales, la flora mayoritaria está compuesta por bacterias pero hongos y levaduras pueden estar también presentes en una alta proporción. Las alteraciones más frecuentes causadas por bacterias son: podredumbre blanda causada por *erwinia carotouora* (acción sobre pectinas), acidez y mucosidad (coliformes,

xantomonas y pseudomonas). Los mohos también causan ablandamiento y alteraciones del color (Mossel y Moreno García, 1985).

4.1.1.4 Productos de alta humedad

Una alternativa a los AHI y a los MP, son los alimentos de alta humedad (AAH). Esta tecnología está también basada en la aplicación de factores de inhibición para combatir el deterioro de los microorganismos en frutas y verduras. Los AAH tienen a_w mayores a 0,92 y los factores en combinación que se utilizan son el escaldado, leve reducción del pH y a_w , y agregado de aditivos conservantes con el fin de obtener productos de alta calidad y, en general, estables a temperatura ambiente.

Un esquema de la aplicación de tecnología de barreras aplicada a AHI, MP y AAH, se muestra en la Figura 4.1

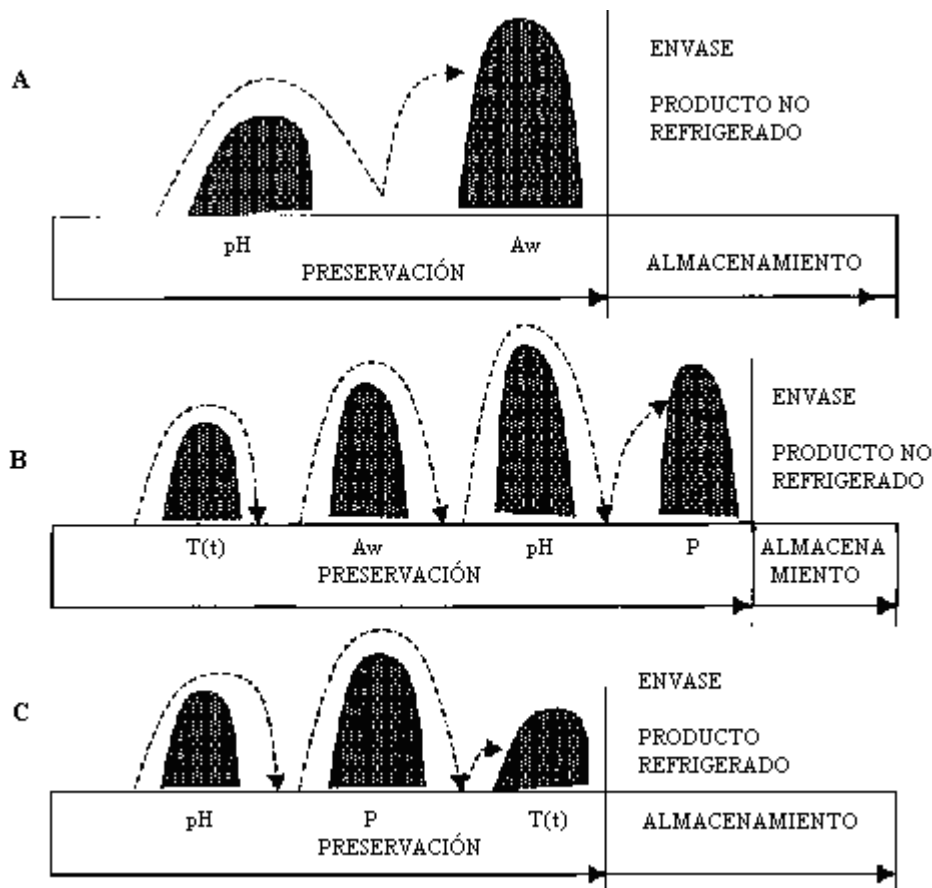


Figura 4.1 Representación esquemática de la tecnología de barreras. Panel A: AHI, panel B: AAH y panel C: MP. Barreras utilizadas: a_w , pH, $T(t)$ tratamiento térmico suave y P (preservadores) (Leistner, 1995).

4.1.2 **El uso de películas comestibles como un factor en combinación**

El concepto de aplicación de recubrimientos comestibles como barrera protectora para alimentos ha sido practicado desde hace largo tiempo. El ejemplo más antiguo y conocido se informa en China (Siglos XII y XIII) y es el de la cobertura de frutas y vegetales con ceras o emulsiones para retardar la desecación y, al mismo tiempo, otorgarles brillo (Donhowe y Fennema, 1994).

Los objetivos que se desean alcanzar al formular una cobertura para frutas y vegetales cortados o no, son algunos de los siguientes:

- formar una barrera eficiente a la pérdida de humedad
- tener una permeabilidad selectiva a los gases
- controlar la migración de solutos para retener pigmentos y nutrientes
- incorporar aditivos tales como colorantes, saborizantes o preservadores que impartan funcionalidades y propiedades específicas

Por supuesto, la obtención de una película “ideal” es todo un desafío.

El uso de películas como soporte de aditivos con el objetivo de extender la vida segura de frutihortícolas ha recibido particular atención en los últimos tiempos. Chien y col. (2005) utilizaron coberturas a base de quitosano, polisacárido con propiedades antimicrobianas, para extender la vida útil de rodajas de mango y comprobaron que dicho recubrimiento efectivamente inhibía el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos. Durango y col. (2004) evaluaron el uso de una cobertura comestible a base de almidón y quitosano en zanahorias mínimamente procesadas, observando una inhibición substancial del crecimiento de bacterias ácido lácticas, coliformes totales psicrótrofos, hongos y levaduras y aerobios mesófilos. En otro estudio, Guilbert (1988) incorporó ácido ascórbico a coberturas a base de caseína o goma carnauba, con las cuales recubrió cubos de papaya y damasco con diferentes actividades de agua (0,70 a 0,90). Las muestra tratadas y los controles (sin cobertura) fueron inoculados con *Aspergillus niger* o *Saccharomyces rouxii*. Luego del almacenamiento a 30°C se observó una significativa mejora en la estabilidad microbiana de las frutas cubiertas, no detectándose alteraciones después de 40 días.

Las películas comestibles también han demostrado ser efectivas en preservar la calidad organoléptica y nutricional de vegetales frescos como hongos y coliflor. Ayranci y Tunc (2002) reportaron que la aplicación de coberturas elaboradas con metilcelulosa y adicionadas con ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido esteárico, produjo un

enlentecimiento de la velocidad de pardeamiento y una reducción de la pérdida de vitamina C en ambos alimentos.

Estos resultados confirman que la aplicación externa de una capa polimérica conteniendo aditivos puede ser utilizada para prevenir el deterioro microbiano, organoléptico y/o nutricional de distintos productos vegetales.

4.1.3 **La calabacita (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret)**

Existe una amplia variedad de especies de la familia *Cucurbitaceae*, la mayoría de los cuales tienen un interesante potencial económico debido a su bajo costo en el mercado mundial y al hecho de que son una buena fuente de nutrientes, especialmente β -caroteno. También son bajas en calorías, ricas en fibras, potasio, riboflavina y Vitaminas C y E (Escalada Pla, 2006).

Los carotenoides (β carotenos) son la mayor fuente de Vitamina A, la cual es necesaria para el normal desarrollo de la visión, crecimiento y evolución embrionaria. La deficiencia de esta vitamina es causa de ceguera y mortalidad infantil. Se ha observado que la absorción de carotenos es mejor a partir de frutas y vegetales amarillos que de hojas verdes. Las calabazas constituyen, por lo tanto, una excelente fuente de carotenos y pueden ser utilizadas para prevenir deficiencias de Vitamina A (Seo y col., 2004).

En la Argentina, el zapallo anco (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) y sinónimos anquito, calabacita, multiplicó su producción a partir de la década del 70, desplazando por sabor y facilidad de manipulación a los zapallos tradicionales. En la actualidad, su importancia es tal que el volumen de producción es tres veces superior a la suma de todas las otras variedades de zapallos (fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, división frutihortícolas, 2005).

4.1.4 **Elaboración de un producto dulce obtenido en base a calabacita**

Debido a la creciente demanda de productos “más naturales” y listos para consumir se seleccionó, para esta parte del trabajo, un producto de origen vegetal como materia prima, el cual fue procesado con la perspectiva de obtener un alimento funcional, de alta calidad, práctico para los consumidores y económico.

La elección de la calabacita criolla para la elaboración de un producto con posibilidad de ser recubierto con una película comestibles, estuvo basada en que:

- Posee buenas cualidades nutricionales y organolépticas
- La calabacita es un alimento que se consume a lo largo de toda nuestra vida y es ampliamente conocido, aceptado y adaptado al gusto de gran parte de nuestra población
- Se trata de un cultivo ampliamente producido en todo el país y de bajo costo, encontrando materia prima fresca durante casi todo el año (Escalada Pla, 2006)

A fin de extender la vida útil del vegetal, se resolvió procesarlo, sometiéndolo a varias técnicas de preservación (tecnología de barreras), previamente a la cobertura con la película comestible. Se obtuvo un producto dulce y listo para consumir.

Este alimento puede estar dirigido a toda la población en general, pero puede ser particularmente consumido por niños en edad escolar, como sustituto de otros productos menos saludables.

Dado que la tecnología empleada fue viable y económica, el producto final puede ser de bajo costo, resultando entonces muy accesible.

4.1.5 Objetivo

En esta parte de la tesis se examinó el uso potencial de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca y portadoras de sorbato de potasio como un factor de estrés en combinación, para controlar el crecimiento microbiano y aumentar la vida segura de un producto dulce obtenido en base a calabacita (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) por la técnica de factores combinados.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4 Preparación de las películas

Las películas portadoras de sorbato de potasio fueron elaboradas a partir de una suspensión acuosa de almidón, glicerol, sorbato de potasio y agua (5,0 : 2,5 : 0,15 : 92,35 en peso). El método de fabricación fue el descrito en la sección 1.2.1.2 (método 2), el cual involucra una rápida velocidad de gelatinización y lenta velocidad de secado.

Luego de la gelatinización, el gel obtenido fue vertido sobre placas de petri de 9-10 cm de diámetro. Posteriormente al secado y una vez constituidas las películas, las mismas fueron separadas de las placas y equilibradas a 25°C, en atmósfera de 75,3% de humedad relativa (solución saturada de NaCl) durante seis días.

5 Preparación del alimento: calabacita procesada por métodos combinados

5.2.1.1 Preparación de la calabacita



La calabacita (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret), fue adquirida en un mercado mayorista de frutas y hortalizas local.

La parte externa de la calabacita fue sometida a un minucioso lavado con agua potable y detergente, luego del cual fue enjuagada con abundante agua destilada.

Una vez lavada, la calabacita fue cortada, con la ayuda de un torno, en rodajas de 16 mm, de espesor perpendiculares a su eje. A partir de estas rodajas se obtuvieron cilindros de 23 mm de diámetro (área total 1199 mm²) empleando un sacabocados metálico, siendo el peso promedio de los cilindros de 6,4 g, aproximadamente. La geometría elegida, si bien no fue la óptima para maximizar el aprovechamiento de la materia prima, fue la que mejor se ajustaba a los requerimientos experimentales de los ensayos a realizarse, en particular los de textura.

Las rodajas de calabacita fueron tratadas térmicamente con vapor de agua a 100°C (presión atmosférica) durante 10 minutos y, luego, rápidamente enfriadas sumergiéndolas en baño de hielo. Se retiraron y escurrieron previamente a la inmersión en jarabe de glucosa.

4.2.2.2 Preparación de solución osmótica de glucosa

En la preparación de la solución de inmersión se emplearon: glucosa monohidratada (cerelose, Saporiti, Argentina) de grado alimenticio, vainillina (Sigma V-2373, USA) y agua destilada en las siguientes proporciones (Escalada Pla, 2006):

198 g glucosa : 186 g agua : 0,09 g vainillina

Para facilitar la disolución de la glucosa, se calentó el agua sobre una platina calefactora y, aplicando agitación, se agregó lentamente el azúcar. Una vez disuelta la glucosa, se adicionó la esencia de vainilla disuelta en una porción de agua previamente separada de la masa total de agua empleada.

La masa total de jarabe preparado fue de 1,15 kg, siendo su pH original 3,9 - 4,0. Para deprimir el pH a $\approx 3,0$ se adicionó ácido cítrico sólido (Anedra, Argentina). La solución de glucosa así obtenida, se dejó estabilizar durante, aproximadamente, 24 horas a 25°C, previo a la inmersión de las rodajas de calabacita.

Se sumergieron 460 g de rodajas de calabacita (aproximadamente 72 rodajas) y se almacenaron a 8°C hasta alcanzar la condición de equilibrio. Se midió la a_w y el pH, tanto del jarabe de inmersión como de las rodajas, a fin de establecer el alcance de dicha condición.

El pH se controló empleando un electrodo de vidrio conectado a un pHmetro (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00 (Anedra, Argentina). El error en la determinación de pH fue de 0,02 unidades.

La actividad de agua se midió con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, WA, USA). Previamente a la medición de actividad de agua se realizó una curva de calibración con soluciones salinas saturadas. El error en la determinación de la actividad de agua fue de 0,005 unidades.

4.2.3 Aplicación de la película sobre el alimento

Luego de seis días de acondicionamiento en la solución osmótica de glucosa, se retiraron las rodajas del jarabe y se escurrieron sobre papel tissue, bajo campana de flujo laminar (Casiba, Argentina), 15 minutos de cada lado. A continuación, se tomaron porciones de cuatro cilindros, cada uno de los cuales fue envuelto con una película comestible de forma tal de cubrir ajustadamente toda la superficie de la rodaja de calabaza. Debido a que las películas presentaron auto adherencia, fue posible mantener las rodajas correctamente recubiertas.

Porciones de cuatro rodajas recubiertas fueron empaquetadas en bolsas impermeables a los gases trilaminadas (polietilentereftalato (PET) / aluminio / polietileno). Las bolsas fueron selladas y almacenadas a 25°C durante 21 días.

Cilindros de calabacita sin envoltura de película comestible y empaquetados dentro de bolsas impermeables, como se explicó anteriormente, fueron también almacenados como sistemas control, con propósitos comparativos.

Las bolsas con muestras control y tratamiento fueron preparadas por triplicado.

4.2.4 **Evaluación de la estabilidad del producto vegetal**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de la película comestible a rodajas de calabacita procesada, en la calidad global del tejido vegetal, se realizaron los siguientes estudios:

4.2.4.1 **Estabilidad microbiológica**

A fin de evaluar el efecto de la envoltura de las rodajas de calabaza con películas comestibles conteniendo sorbato de potasio, sobre el desarrollo de la flora microbiana del alimento, se llevaron a cabo los siguientes recuentos:

- *Aerobios mesófilos*: se realizó recuento en profundidad utilizando agar PCA (Plate agar count, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) luego de 72 horas de incubación a 37°C.

- *Bacterias lácticas*: se realizó recuento en profundidad utilizando agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) luego de 72 horas de incubación a 37°C.

- *Hongos y levaduras*: se realizó recuento en superficie de agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) luego de 5 días de incubación a 25°C.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el Compendium of the Methods for the Microbiological Examination of Foods (Vanderzant and Splittstoesser, 1992).

▪ **Toma de muestra**

Las bolsas fueron abiertas bajo flujo laminar (Casiba, Argentina) y se retiraron las rodajas de calabaza de su interior con la ayuda de una pinza estéril.

Los recuentos mencionados se realizaron tanto para la superficie de la película como en el tejido de calabaza, siguiendo las metodologías que se describen a continuación para la toma de muestra:

a) *hisopado de la superficie de película*: una superficie de 314 mm² de las películas comestibles cubriendo las rodajas de calabaza fueron muestreadas con un hisopo estéril (Copan, Italia) previamente impregnado en agua peptona, con la ayuda de una máscara de aluminio estéril de 20 mm de diámetro. La carga microbiana de la superficie fue resuspendida sumergiendo el hisopo en 4 mL de agua peptona contenida en un tubo y agitando en vortex durante 30 segundos a 2500 RPM. Se realizaron los ensayos microbiológicos mencionados a partir de diluciones adecuadas de la suspensión de microorganismos obtenida.

b) *homogenato del tejido de calabaza*: las rodajas de calabaza (desprovistas de la película comestible en el caso de los tratamientos y directamente para el caso de los controles) fueron introducidas en bolsas estériles (Nasco Whirl-Pack, USA) previamente taradas. Se agregó dentro de la bolsa un volumen de agua peptona igual al producto de la masa de muestra multiplicado por 9 (dilución 1/10). Se homogeneizó el contenido de la bolsa en un homogeneizador tipo “stomacher” durante 40 segundos. Se realizaron los recuentos microbiológicos mencionados a partir de diluciones adecuadas del homogenato obtenido.

La toma de muestra se realizó a tiempo cero y luego de 21 días de almacenamiento a 25°C.

4.2.4.2 Estabilidad química

i) pH y a_w

Se determinó el pH y a_w tanto en la película comestible como en la rodaja de calabaza una vez desenvuelta, a tiempo inicial y final (21 días).

Los cambios de peso de las muestras también fueron registrados.

ii) Determinación de sorbato de potasio

La concentración de sorbato de potasio en la película y en la calabaza por separado fue evaluada de acuerdo al método AOAC descrito en sección 1.2.2.6.

En este caso los destilados fueron diluidos a 500 mL y en la determinación colorimétrica se efectuaron diluciones apropiadas a fin de que las lecturas de las muestras no excedieran los valores de absorbancia de la curva de calibración.

4.2.4.3 Estabilidad organoléptica

i) Atributos de color

El color del tejido vegetal fue medido usando un colorímetro marca Minolta, modelo CM-508d (Tokyo, Japón) previamente calibrado con una placa blanca patrón.

Se determinaron los parámetros L , a y b de la escala Hunter (seleccionando iluminante D65 y observador a 2°) de los sistemas controles y tratamiento a tiempo inicial y luego de 21 días de almacenamiento.

▪ **Metodología**

Se colocó una rodaja de calabaza en un recipiente cilíndrico de vidrio y Teflon®, especialmente diseñado (20 mm de diámetro y 3 mm de altura), y se distribuyó el tejido con una espátula a fin de llenar el volumen del recipiente. La base de vidrio del portamuestra se apoyó sobre la abertura de salida del haz de luz del equipo y se cubrió la parte superior del recipiente con una placa blanca de referencia. Todas las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado y se informan los valores medios.

ii) Textura

Los sistemas control y tratamientos (sin la cobertura) fueron colocados sobre el plato fijo de una máquina universal de testeo Instron (modelo 1011, Instron Corp., Canton, MA, USA) y se comprimieron a una velocidad de 5 mm/min hasta observar fractura del tejido vegetal.

Se registraron las curvas de fuerza en función del tiempo y se convirtieron a curvas de fuerza - distancia de deformación. A partir de estas últimas se obtuvo la firmeza del material.

▪ **Firmeza:** se tomó el punto de máxima fuerza de la curva y se dividió este valor por la deformación en dicho punto. En el caso de no registrarse un máximo neto, se tomó la fuerza correspondiente al cambio de pendiente de la curva (Escalada Pla, 2006).

4.2.4.4 Análisis estadístico

Todas las determinaciones fueron realizadas, al menos por triplicado, y se informan los correspondientes promedios. Para determinar diferencias significativas entre los parámetros evaluados se utilizó un test “t” con un nivel de confianza α : 0,05 empleando el programa Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, 1997 (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Preparación de la calabacita procesada

4.3.1.1 Controles previos al recubrimiento con película comestible

El jarabe de inmersión, previo al agregado de las rodajas de calabaza, presentó un pH de 3,0 y un a_w de 0,899. Por su parte, las rodajas de calabacita escaldadas exhibieron un pH de 6,05 y una a_w de 0,995.

Luego de sumergidos los cilindros en la solución osmótica de glucosa, se controló el pH y a_w del tejido de calabaza como así también del jarabe de inmersión, durante el período de estabilización a 8°C.

La Figura 4.2 muestra la evolución de estos parámetros durante seis días de almacenamiento.

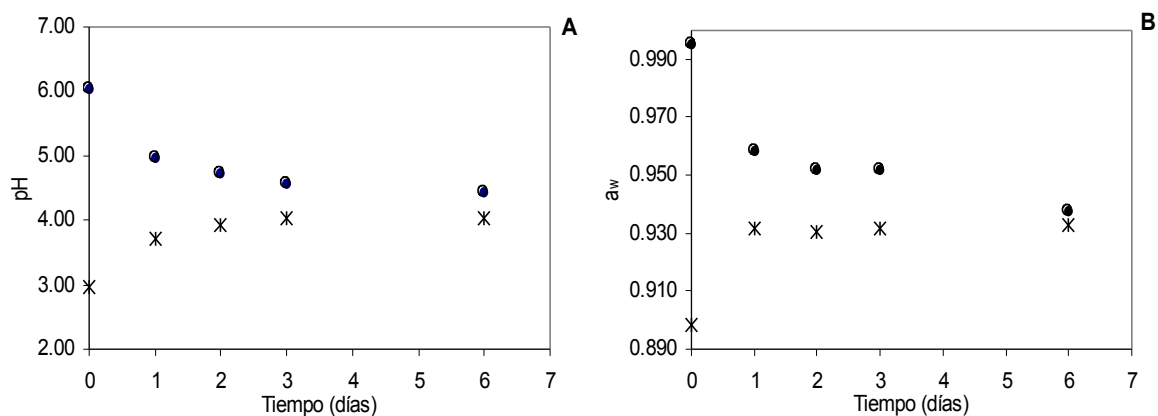


Figura 4.2 Evolución del pH (panel A) y a_w (panel B) del jarabe de inmersión (□) y rodajas de calabaza sumergidas (●) previo al recubrimiento con películas comestibles.

En el momento del recubrimiento de los cilindros con la película de almidón portadora de sorbato de potasio (KS), el a_w y el pH de la calabaza fueron de 0,938 y 4,4, respectivamente.

4.3.2 Evaluación de la estabilidad del producto vegetal

4.3.2.1 Estabilidad microbiológica

El nivel de aerobios mesófilos, de bacterias ácido lácticas y de hongos y levaduras estuvo por debajo de las 42 UFC/cm² en la superficie de las películas que cubría los cilindros de calabaza, tanto a tiempo cero como después de 21 días de almacenamiento. Este resultado muestra que la carga microbiana inicial de las

películas fue baja y demuestra, además, que las películas utilizadas ejercieron un efecto de barrera eficiente para prevenir la contaminación externa.

La Figura 4.3 muestra la evolución de la flora nativa en el tejido de las muestras tratadas luego de haber retirado la película. Puede apreciarse que los niveles de aerobios mesófilos, luego del almacenamiento, decrecieron 2 ciclos logarítmicos. En el caso de bacterias ácido lácticas y de hongos y levaduras, sus poblaciones iniciales en la calabaza fueron, aproximadamente de 150 UFC/g. Luego de 21 días, estas poblaciones decrecieron en forma significativa.

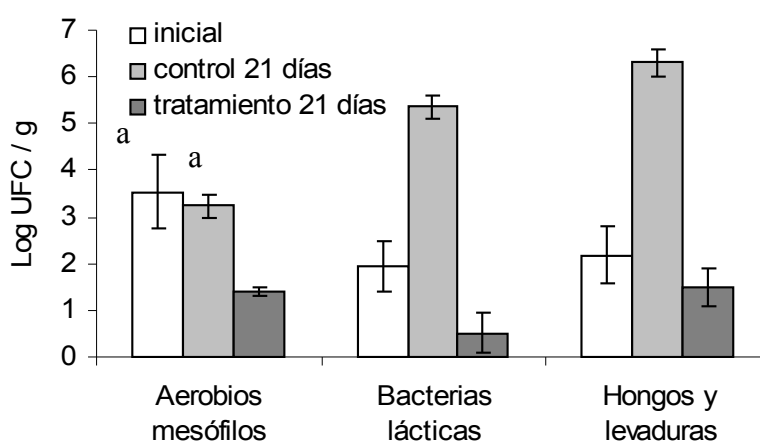


Figura 4.3 Evolución de la flora nativa en muestras de calabaza. Barras seguidas por la misma letra no difieren significativamente (α : 0,05)

En un ensayo con frutillas frescas, García y col. (1998) utilizaron coberturas a base de almidón de alta amilosa y glicerol, solas o adicionadas con KS y comprobaron que dichos tratamientos, eran efectivos para inhibir el crecimiento de aerobios mesófilos y de hongos y levaduras.

En este trabajo, se observó que en las muestras control, el nivel de aerobios mesófilos luego del almacenamiento fue similar al inicial. Sin embargo, estas muestras presentaron una apariencia inaceptable debido a que su superficie fue contaminada por hongos y el tejido exhibió un aspecto reblandecido y acuoso. Este comportamiento estuvo relacionado con el alto recuento de hongos y levaduras como así también de bacterias ácido lácticas (Figura 4.3), ya que son ampliamente conocidas las alteraciones causadas por microorganismos en vegetales: podredumbre blanda (acción sobre las pectinas), acidez y mucosidad (Doley, y col., 1997; Mossel y Moreno García, 1985).

Debido a que el envasado no fue realizado al vacío, existió una cierta disponibilidad de oxígeno dentro de las bolsas. Esta cantidad de oxígeno remanente fue, suficiente para permitir el desarrollo de hongos en el área lateral de las

calabacitas controles. Por otro lado, permitió también un importante desarrollo de bacterias ácido lácticas, lo que condujo a una marcada acción sobre los azúcares fermentecibles del alimento, con la consecuente reducción del pH, como se detalla en el siguiente ítem.

De acuerdo a estos resultados, la aplicación de la cobertura comestible, generó un impedimento substancial al desarrollo de la flora: disminuyó el recuento de aerobios mesófilos en dos ciclos log, y en el caso de las bacterias ácido lácticas y de los hongos y levaduras se verificó una disminución de 4 ciclos log de la población en relación a las muestras control.

Dicha inhibición podría haberse manifestado por:

1- incorporación de un agente antimicrobiano en la formulación de las películas, capaz de difundir hacia el interior del tejido, incorporando una barrera de estrés microbiano adicional.

2- reducción de la disponibilidad de oxígeno, ya que como se mostró en el capítulo 1, estas películas poseen una muy reducida permeabilidad al oxígeno

Estos dos efectos podrían haber actuado cooperativamente.

4.3.2.2 Estabilidad química

- Cambios en pH y a_w

La Tabla 4.1 presenta los valores de pH y a_w de las muestras de calabaza control y de calabaza cubierta con la película comestible.

Tabla 4.1 pH y a_w de las rodajas de calabaza

	Inicial	21 días	
		Control	Cubiertas
pH	4,4 ± 0,1	3,3 ± 0,3	5,1 ± 0,1
a_w	0,938 ± 0,004	0,951 ± 0,002	0,918 ± 0,003

Los valores informados corresponden al promedio de tres determinaciones y su desvío estándar.

El pH de la calabaza control decreció a un valor de 3,3 como resultado del metabolismo de bacterias ácido lácticas. Sin embargo, el a_w se incrementó a 0,951, probablemente como consecuencia de cambios inducidos por la actividad metabólica de la flora microbiana (reacciones de hidrólisis).

Por otro lado, el pH de las rodajas de calabaza recubiertas alcanzó un valor de 5,1 y el a_w decreció a 0,918, debido al contacto con la película comestible de pH inicial 6,6 y a_w 0,755.

La pérdida de peso de las rodajas de calabaza envueltas fue del $(15,1 \pm 1,8)\%$ al final de la experiencia. Este resultado puede atribuirse, al menos parcialmente, a la transferencia de agua desde la calabaza a la película, ya que se registró un mayor valor de a_w (0,902) para las películas comestibles utilizadas, luego de 21 días de almacenamiento. La pérdida de peso reportada en este trabajo es similar a la informada por García y col. (1998) para frutillas con cobertura en base a almidón. En el caso de las muestras control, la pérdida de peso no pudo ser determinada debido al alto grado de deterioro del tejido vegetal.

Los resultados obtenidos muestran que la depresión de a_w a 0,938, el ajuste del pH a 4,4 con ácido cítrico junto con el empleo de un envase impermeable, no fueron suficientes para preservar las rodajas de calabacita y remarcan la necesidad de un factor adicional de estrés, tal como la adición de un agente preservador, el cual puede ser provisto mediante su incorporación a la formulación de una película comestible, como se propone en el presente trabajo.

Algunas ventajas importantes que presenta la alternativa de películas portadoras de antimicrobianos en relación a la mantención del producto en la solución de ósmosis, están relacionadas con:

- el sorbato de potasio en el líquido de inmersión se puede degradar a lo largo de la vida útil de este tipo de productos. Según lo reportado por Tapia y col (1995), en el caso de papayas y mango preservados por métodos combinados (a_w 0,987-0,980; pH 3,5; KS 1000 ppm; NaSO_3 150 ppm), el sorbato se degrada un 50 % al cabo de 90 días de almacenamiento y se verifica el desarrollo de *Z.bailii*. Si el preservador se encuentra en la película y liberándose gradualmente a lo largo del almacenamiento, es posible que esté menos expuesto a degradarse que si se encuentra desde el inicio en el seno del líquido de inmersión.

- la reducción del volumen del producto y de los costos de envasado y transporte relacionados. La comercialización de ciertos productos vegetales de alta a_w (conservas y enlatados) en general requiere de un medio líquido conteniendo el o los agentes conservantes, además del tratamiento térmico correspondiente, lo que determina que el volumen y peso de estos productos se vea incrementado considerablemente. Es también sabido el costo elevado de la hojalata, el aluminio, polímeros sintéticos, laminados y otros materiales utilizados para envasar estos alimentos. Por lo tanto, el uso de películas comestibles podría contribuir a minimizar

los costos de producción y de transporte, haciendo posible el empleo de materiales de empaquetamiento más económicos y/o un menor volumen de ellos.

- **Migración de sorbato de potasio**

La migración del antimicrobiano desde la película a las rodajas fue verificada por medio de la determinación del contenido de sorbato de potasio en los cilindros de calabaza recubierta. La concentración promedio observada fue de $(2,59 \pm 0,08)$ g/kg luego de 21 días de almacenamiento. Dicha cantidad representa, aproximadamente, un 40% del total de KS contenido inicialmente en la película (15 g/kg). El nivel de antimicrobiano permitido por el CAA en su art. 807 (Alimentos azucarados), para este tipo de productos es 1500 ppm (1,5 g/kg) de ácido sórbico. Por lo tanto se deben tomar los recaudos necesarios en cuanto a la cantidad de sorbato presente en la película a fin de no exceder los límites permitidos por la legislación.

Es importante mencionar que el contenido de preservador remanente en la película luego de 21 días de aplicación sobre el alimento fue en promedio de $(7,14 \pm 0,77)$ g/kg, sugiriendo que parte del sorbato de potasio originalmente incorporado a la película, sufrió degradación a lo largo del almacenamiento. Es bien conocido que el sorbato de potasio sufre degradación autooxidativa en sistemas modelo y en productos alimenticios, y que la magnitud de esta reacción depende de la composición del sistema (Gerschenson y Campos, 1995).

4.3.2.3 Estabilidad organoléptica

i) Atributos de color

En la Figura 4.4 se aprecian los cambios producidos en los valores de la escala de color Hunter para las rodajas de calabaza controles y cubiertas, tanto a tiempo cero como luego de 21 días de almacenamiento a 25°C.

El valor de *a* fue el más afectado luego del almacenamiento, ya que inicialmente tomó valores positivos (10,75), y luego de 21 días disminuyó significativamente a 6,8 para los controles y drásticamente para los tratamientos, incluso tomando en este caso valores negativos (-1,59).

El parámetro *b*, también se redujo significativamente luego de 21 días para ambos sistemas (control y tratados).

La pérdida de color de los frutos y vegetales amarillos, naranjas y rojos, está asociada a la degradación de los pigmentos (carotenoides) presentes en ellos. Los

pigmentos que le otorgan a la calabaza su característico color naranja son, mayoritariamente, α y β -carotenos y licopeno (Seo y col., 2005).

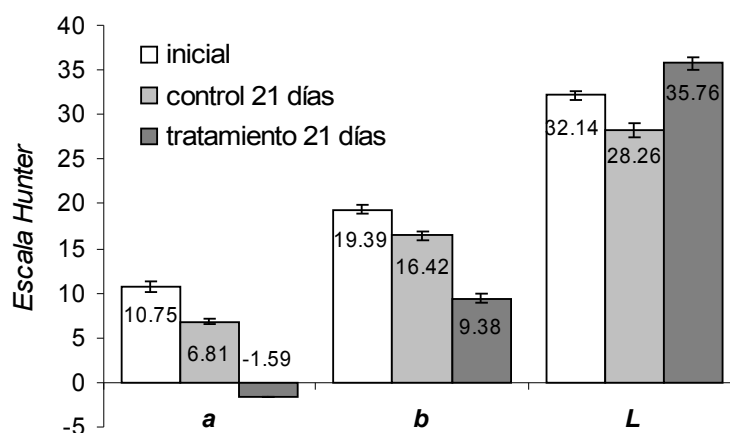


Figura 4.4 Cambios en los parámetros de color de las rodajas de calabaza (escala Hunter).

Tan marcada caída de los valores de a y b corresponde, entonces, a una importante degradación de los carotenoides presentes en el tejido de calabaza (Dutta y col., 2006).

Varios factores son los responsables de la pérdida de pigmentos y de color durante el procesamiento de los alimentos. Se pueden mencionar el browning enzimático y no enzimático, condiciones de proceso tales como el pH, acidez, oxidación, material de empaquetamiento, duración y temperatura de almacenamiento (Ahmed y col., 2002)

La pérdida de color registrada en nuestro ensayo, estaría relacionada con la interacción del pigmento con algún componente de la película comestible, que haya difundido desde el recubrimiento hacia el interior del vegetal (glicerol y/o KS) el cual actuaría como sustancia prooxidante.

El KS, puede considerarse como la sal de un ácido graso de cadena corta (6 carbonos). Existen numerosos trabajos que analizan el efecto de la composición de ácidos grasos insaturados en la estabilidad de los carotenoides frente a procesos oxidativos, arribando estos informes a resultados contradictorios. Por un lado, se observó que el cambio del perfil lipídico de un medio poliinsaturado a otro monoinsaturado en productos derivados del pimiento rojo, mejora la estabilidad de los carotenoides. Por el contrario, se reportó que el β -caroteno es más inestable que el ácido linoleico y por lo tanto, puede preservarlo en sistemas modelo durante tratamientos térmicos (Meléndez-Martínez y col., 2006).

Seow y Cheah, (1984) informaron que el sorbato de potasio, en presencia de glicerol, incrementa su velocidad de degradación en sistemas ácidos de a_w alto (0,7-1,0). Por lo tanto, en el presente trabajo, el sorbato incorporado a la calabaza, podría promover reacciones de autooxidación, disparando una cadena de reacciones degradativas del pigmento.

En el caso de las rodajas envueltas con películas, se observó un incremento significativo en el valor de L (Figura 4.4). Globalmente, se apreciaba una disminución muy marcada del color naranja, y un aumento la claridad de las rodajas recubiertas. Por otro lado, en las muestras control se registró un oscurecimiento, lo que promovió una disminución en el valor de L .

Es importante remarcar, que si bien tanto los controles como los tratamientos tuvieron reducidas tensiones de oxígeno (bolsas impermeables), las reacciones de degradación son aún viables. Saguy y col. (1985) determinaron que las velocidades de degradación del β -caroteno incorporado a celulosa microcristalina en contacto con atmósferas de concentración de oxígeno desde 20% (aire) hasta 1%, se reducían aproximadamente en un orden de magnitud en dicho rango, ocurriendo degradación del pigmento en todas concentraciones de oxígeno analizadas.

ii) Textura

En la Figura 4.5 se muestran curvas típicas de fuerza - distancia para las calabazas recubiertas y controles.

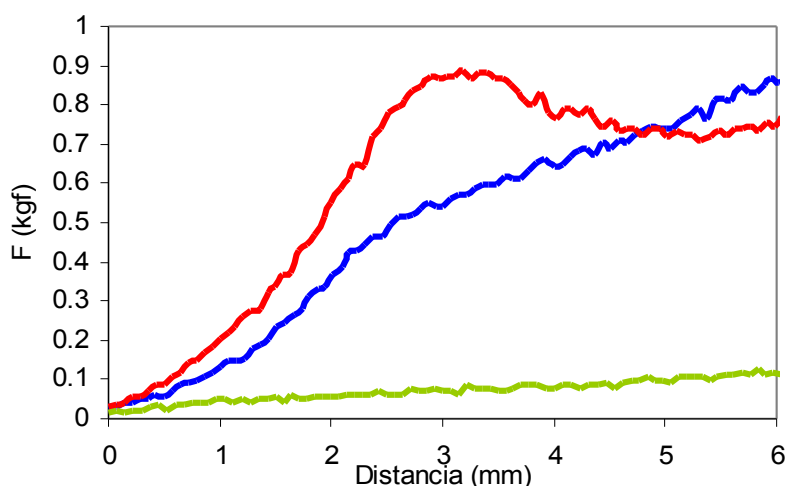


Figura 4.5 Curvas típicas fuerza - distancia para los cilindros de calabaza
— inicial, — cubiertas 21 días, — controles 21 días

Se observa que luego del tratamiento (21 días) el tejido vegetal sufre una disminución en la fuerza de fractura (ablandamiento) debido a varios factores: pérdida

de la turgencia celular, pérdida de aire extracelular y vascular, degradación de la pared celular (Aguilera y Stanley, 1999). Sin embargo este ablandamiento fue mucho menor en el caso de las muestra cubiertas con película comestible, mostrando que su aplicación reduce los cambios indeseables de textura, probablemente promovidos por el desarrollo microbiano como en el caso de los controles.

Los valores de firmeza obtenidos fueron: $(0,26 \pm 0,05)$ kgf/mm para los cilindros de calabaza a tiempo inicial y $(0,18 \pm 0,03)$ kgf/mm para los cilindros cubiertos luego de 21 días. En el caso de los sistemas controles (sin cubrir), luego del almacenamiento no fue posible calcular este parámetro debido al gran deterioro sufrido por el tejido.

4.3.3 Conclusiones

El estudio de la estabilidad química, microbiológica y organoléptica de un producto vegetal tratado por la tecnología de barreras y recubierto con película comestible como un factor adicional de estrés, permitió establecer que:

- ✓ El uso de películas comestibles elaboradas con almidón de mandioca y conteniendo KS, para cubrir cilindros de calabacita procesada por métodos combinados, puede actuar eficazmente como barrera a la contaminación externa por microorganismos.
- ✓ Las películas pueden actuar como un soporte eficaz del preservador capaz de prevenir el crecimiento microbiano en la superficie y, al mismo tiempo, controlar la flora deteriorativa en el tejido de calabacita, ya que parte del contenido de antimicrobiano de la película difundió al alimento. Este hecho determinó una importante reducción del recuento de aerobios mesófilos, bacterias ácido lácticas, hongos y levaduras.
- ✓ Las películas utilizadas permitieron mantener la textura del vegetal preservado pero no así el color del mismo.

En relación a los cambios físico - químicos observados, se debe tender a modificaciones en la formulación de la película comestible para evitar el incremento de pH, minimizar la pérdida de peso, los cambios de color y asegurar un contenido de KS en el producto que esté en concordancia con los máximos niveles permitidos por el CAA asegurando así su salubridad y calidad.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de metodologías apropiadas para la elaboración de películas comestibles en base a almidón de mandioca y glicerol, permitió arribar a las siguientes conclusiones:

↪ La técnica utilizada en la obtención de las películas afectó, en general, sus propiedades físico-químicas ya que:

- Tiempos prolongados de gelatinización y bajas velocidades de secado (método 1; películas M1) resultan en una red más sólida con mayor grado de cristalinidad y menor permeabilidad al vapor de agua (PVA). Este método permite la mayor organización de las cadenas poliméricas de almidón, obteniéndose una estructura altamente ordenada.
- Un incremento en la velocidad de calentamiento (método 2; películas M2) provoca una disminución en la cristalinidad, con la concomitante caída del módulo elástico.
- La rápida evaporación del agua durante el secado (método 3, películas M3) asociada a una más rápida gelatinización, da origen a una matriz menos organizada y, consecuentemente, más amorfa. Esta característica estructural, afecta sus propiedades sorcionales, aumentando el contenido de humedad, y empobreciendo sus propiedades de barrera al vapor de agua. No obstante, se observó una disminución en la permeabilidad al oxígeno en este tipo de películas. Es de destacar, que todas las películas desarrolladas son una efectiva barrera a la transmisión del oxígeno, comparable a los materiales sintéticos de empaquetamiento.
- Esta última metodología (método 3) previene más eficientemente la degradación del sorbato de potasio soportado en las películas y esto determina un menor desarrollo de color pardo. Sin embargo, da origen a películas con propiedades mecánicas empobrecidas lo cual puede afectar la funcionalidad de las películas.
- La solubilidad en agua no se ve significativamente afectada por la metodología de fabricación, pero sí por la presencia del antimicrobiano ya que se observó un aumento de la solubilidad de las películas por la presencia del sorbato.

Se puede concluir entonces que, en función del alimento a recubrir y del propósito para el cual se plantea la aplicación de coberturas comestibles, es posible seleccionar el método de elaboración adecuado que proporcione una película funcional y organolépticamente aceptable.

Del estudio de la influencia del método de fabricación en la liberación del sorbato de potasio soportado en las películas a medios líquidos y semisólidos, se pueden destacar los siguientes hechos:



Para la liberación de sorbatos a un medio líquido:

- Independientemente del método empleado en la fabricación de las películas, el sorbato de potasio es liberado rápidamente de la matriz de almidón, ya que ocurre una alta transferencia del antimicrobiano al medio acuoso luego de 30 minutos de inmersión. Este comportamiento es consecuencia de la característica altamente hidrofílica del almidón.
- La cinética de liberación ajusta a un modelo de primer orden en un rango de pH del medio receptor entre 3,0 y 6,0.
- La cinética de liberación del antimicrobiano es afectada por la técnica de gelatinización y secado empleada, ya que se observó que la constante de velocidad (k) fue mayor para las películas M3. Este hecho puede ser una consecuencia de la mayor proporción de fase amorfa en la matriz de almidón.
- Asimismo, la fracción de sorbato liberada en el equilibrio (Q_{inf}) fue más elevada en el caso de las películas M1, posiblemente debido a su mayor cristalinidad, lo cual determina una menor interacción con los sorbatos.
- El pH del medio líquido receptor afecta el valor de k ya que, un mayor pH determinó un valor de k más alto, probablemente debido al incremento de la solubilidad del sorbato de potasio con el pH, en sistemas acuosos.
- La liberación del sorbato de potasio puede ser descrita por un modelo matemático simple que considera tanto la difusión del agua, como la relajación de la matriz macromolecular y la difusión del sorbato de potasio a través de dicha matriz.

- El método 3 de fabricación, por el cual se obtienen películas con alta proporción de fase amorfa, determina la mayor contribución de relajación de la matriz a la liberación del antimicrobiano. Esta tendencia puede ser atribuida a un efecto incrementado de la relajación polimérica en la cinética de absorción de agua involucrada.
- El coeficiente de difusión del sorbato aumenta levemente con el valor de pH del medio receptor, lo cual podría estar relacionado con el efecto del pH en el equilibrio de disociación del sorbato.



Para la liberación de sorbatos a un medio semisólido:

- En general, la velocidad de liberación y el valor asintótico en un medio semisólido son más bajos que aquellos observados para el medio líquido, debido a la restricción a la movilidad que impone una estructura tipo gel.
- Las películas obtenidas con un mayor grado de cristalinidad presentan una mayor fracción de sorbato liberada en el equilibrio (Q_{inf}), como consecuencia de la reducción de interacciones tipo puente de hidrógeno entre la matriz amilácea y el sorbato
- Cuanto mayor es la fracción amorfa de las películas, aumenta la velocidad de liberación del sorbato de potasio.

Dado que las películas pueden ser pensadas como medio para la provisión de sorbatos al interior de un alimento y/o como barrera a la contaminación externa, debido a la posibilidad de mantener una alta concentración del antimicrobiano en la superficie, es interesante recalcar que estas características diferenciales de movilidad del preservador con el método de fabricación, podrían condicionar la funcionalidad antimicrobiana de las películas.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de las películas comestibles soporte de sorbato de potasio para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, las conclusiones relevantes son:

- ↪ Para la efectividad de los sorbatos liberados a un medio líquido:
- El método de fabricación no condicionó, en general, la efectividad del sorbato de potasio ya que su desempeño fue similar para todas las metodologías ensayadas
 - Tanto la adición directa de sorbato como su liberación desde la película, tienen similares efectos sobre el crecimiento de *Z.bailii*: a pH 4,5 se produce un retardo en el desarrollo de la levadura mientras que a pH 3.0, se logra una reducción de la población de 2 ciclos logarítmicos. Estos resultados están relacionados con el nivel de antimicrobiano alcanzado en los caldos y con la mínima concentración inhibitoria (MCI) necesaria para inhibir el desarrollo de *Z.bailii*

- ↪ Para la efectividad de la película como barrera antimicrobiana:
- La película actúa como barrera eficaz a la contaminación externa, ejerciendo un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de la levadura en un producto semisólido acidificado (pH 4,5) y de alta actividad de agua (a_w 0,98).
 - La metodología empleada en la elaboración de las películas no afecta su eficacia como barrera a la contaminación. Esto permite seleccionar una técnica de elaboración apropiada de acuerdo a las propiedades físico-químicas deseadas, sin resignar eficiencia antimicrobiana.

De esta manera, se desea destacar que las películas estudiadas presentan potencial aplicación como factor de estrés para la inhibición del crecimiento microbiano por constituir un medio para el abastecimiento de agentes preservadores, ya sea a través de la liberación de los mismos al alimento en contacto, y/o por actuar como barrera a la contaminación externa de dichos alimentos.

Del análisis de la influencia de los cambios en la formulación de las películas en el desempeño del sorbato de potasio liberado a un medio líquido surgieron las siguientes conclusiones:

↪ El contenido de sorbato y el pH de las películas condicionan su la efectividad en cuanto al control del desarrollo de *Z.bailii* en caldo Sabouraud de pH 4,5 y 3,0. Este hecho tiene relación con la fracción de antimicrobiano liberado y la MCI necesaria para inhibir el desarrollo de la levadura en dichos caldos.

↪ La mayor acción antimicrobiana se asocia con altos niveles de sorbato (30g/Kg) y altos valores de pH en la película (6,5). Ello estaría vinculado a dos eventos principales: a la necesaria disminución del contenido de sorbato de potasio en las películas elaboradas a pH 3,0 y 4,5, a fin de evitar la precipitación del preservador; y adicionalmente, a la destrucción del sorbato durante el proceso de elaboración de estas películas.

↪ La composición de las películas en cuanto a concentración de sorbato y pH, no afectó la fracción de preservador liberada. En todos los casos se observó un alto grado de liberación al medio líquido (90 - 98%).

↪ La presencia de aceite en el caldo receptor a pH 4,5, proveniente de la matriz de la película, disminuye la eficiencia del sorbato de potasio liberado. Ello sería consecuencia del reparto del antimicrobiano entre la fase oleosa y la fase acuosa.

↪ La biodisponibilidad de los sorbatos soportados en películas elaboradas con almidón de mandioca entrecruzado con trimetafosfato de sodio (STMP) es similar a la registrada para películas fabricadas con el almidón nativo, para un mismo nivel de preservador incorporado a ellas.

En relación al efecto de la composición de las películas sobre su efectividad como barrera a la contaminación externa en un producto semisólido acidificado (pH 4,5) y de alta actividad de agua (a_w 0,98) se puede destacar que:

↪ El preservador está disponible para controlar el crecimiento de la levadura y su efectividad dependió de la formulación y pH de las películas. La acción antimicrobiana frente a *Z.bailii*, es mayor cuanto mayor es el contenido de sorbato presente. La reducción de la concentración del antimicrobiano no se ve balanceada por la disminución de pH en la película.

↪ La presencia conjunta de aceite de soja y sorbato de potasio, determina un efecto antagónico en el desempeño del antimicrobiano, ya que el crecimiento de *Z.bailii* fue favorecido cuando el lípido formaba parte de la composición de las películas. El reparto del sorbato en la fase oleosa estaría determinando tal condición.

↪ El entrecruzamiento del almidón con STMP al nivel ensayado, no afecta las propiedades de barrera a la contaminación de las películas de almidón de mandioca.

Del estudio de la influencia de la presencia de lípidos o de la utilización de almidón de mandioca entrecruzado en algunas de las propiedades físico-químicas de las películas portadoras de sorbato, puede mencionarse que:

↪ La presencia de aceite o el uso de almidón entrecruzado con STMP en la elaboración de las películas, determina una menor interacción de la matriz polimérica con el agua, ya que el contenido de humedad a una dada actividad acuosa y la solubilidad disminuyen, en comparación con las películas elaboradas en ausencia de lípido o con el almidón nativo.

↪ La presencia de aceite o el uso de almidón entrecruzado con STMP no influye en la permeabilidad al vapor de agua.

↪ El empleo de almidón entrecruzado reduce el índice de amarillo y aumenta la luminosidad de las películas elaboradas con este almidón.

A partir del estudio de la estabilidad química, microbiológica y organoléptica de un producto vegetal tratado por la tecnología de barreras y usando la película comestible como un factor adicional de estrés, se pudo comprobar que:

↪ la aplicación de películas comestibles como un factor en combinación para extender la vida útil de un producto vegetal es factible porque:

- La película actúa eficazmente como barrera a la contaminación externa por microorganismos ya que previene el crecimiento microbiano en la superficie
- La película reduce notablemente la flora deteriorativa de los trozos de calabaza ya que parte del contenido de antimicrobiano de la película fue liberado al alimento

- Las películas retardan la degradación del tejido vegetal, evitando cambios indeseables en la textura, aunque no previenen la decoloración del producto

Finalmente, se destaca que los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan importante información para contribuir a la optimización del desarrollo de películas comestibles y, de esta forma, avanzar en el desarrollo de alimentos saludables y nutricionalmente adecuados.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Achanta, S. y Okos, M. R. (1995). Impact of drying on biological product quality. En Barbosa-Cánovas G. V. y Welti-Chanes J. (Eds.) *Food Preservation by Moisture Control: Fundamentals and Applications - ISOPOW Practicum II*. Technomics Publishing Co., Inc., Lancaster, U.S.A.
- Aguilera J. M. y Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*. 2º ed. Aspen Publishers Inc., Maryland, U.S.A.
- Ahmed, J., Shivhare, U. S. y Sandhu, K. S. (2002). Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, 67(7), 2692-2695.
- Andres A., Betoret N., Bernardet G. y Fito P. (2004). Proceedings of the 14th International Drying Symposium. San Pablo, Brasil (22-25 August 2004). Vol. C., 1599-1603.
- An-Erl King, V. (1993). Studies on the control of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* by using response surface methodology to achieve effective preservation at high water activities. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 519-529.
- Anker, M., Berntsen, J., Hermansson, A-M. y Stading, M. (2001). Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 81-92.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis. Washington, DC: 13th ed., Association of Official Analytical Chemists.
- Arvanitoyannis, S.I., Nakayama, A. y Aiba, S. (1998a). Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37, 371-382.
- Arvanitoyannis, S.I., Nakayama, A. y Aiba S. (1998b). Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers*, 36, 105-119.
- ASTM D778-97. (2002). Standard Test Methods for Hydrogen Ion Concentration (pH) of Paper Extracts (Hot- Extraction and Cold-Extraction Procedures). Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM D4092. (1996). Standard Terminology: Plastics: Dynamic mechanical properties. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM E96-00. (2000). Standard Test Method for water vapour transmission of Materials. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM E1925. (1988). Standard Test Method for yellowness index of plastics. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM 3895-02 (2002). Standard Test Method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor.

- Atichokudomchai N. y Varavinit S. (2002) Characterization and utilization of acid-modified cross-linked Tapioca Starch in pharmaceutical tablets. *Carbohydrate Polymers*, 53, 263-270.
- Ayranci, E. y Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry*, 80, 423-431.
- Azukas, J.J. (1962). Sorbic acid inhibition of enolase from yeast and lactic acid bacteria. Thesis. Michigan State Univ., Estados Unidos.
- Bair H. E. (1981). *Thermal Characterization of polymeric materials*. Edited by E. A. Turi, EEUU, by Academic Press. Vol 2, cap. 10.
- Baker, R., Baldwin, E. y Nisperos-Carriedo, M. (1994). Edible coatings and films for processed foods. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (pp 89-104). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- Baldwin E. A. (1994). Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present, and future. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 89-104). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- Bangyekan, C., Aht-Ong, D. y Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate polymers*, 63, 61-71.
- Barreiro, J. A., Fernández, S. y Sandoval, A. J. (2003). Water sorption characteristics of six row barley malt (*Hordeum vulgare*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 37-42.
- Batthey, S. A., Duffy, S. y Schaffner, D. (2002). Modelling yeast spoilage in cold filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1901-1906.
- BeMiller, J.N. y Whistler, R.L. (1996). Carbohydrates. En O.R. Fennema, *Food Chemistry* (pp.157-320). New York: Marcel Dekker Inc.
- Beuchat, L. R. (1982). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *Journal of Food Science*, 47, 1679-1682.
- Beuchat, L.R. (1981). Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 472-481.
- Beuchat, L. R. (1976). Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Mycopathologia*, 59, 175-179.
- Biliaredis, C. G. (1994). Characterization of starch networks by small strain dynamic rheometry. En R. J. Alexander y H. F. Zobel, *Developments in carbohydrate chemistry* (pp. 87-135). St Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists.
- Binstok, G. (1998). Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

- Biquet, B. y Labuza, T.P. (1988). Evaluation of the moisture permeability characteristics of chocolate films as an edible moisture barrier. *Journal of Food Science*, 53(4): 989-997.
- Blennow, A., Bay-Smidt A. M., Olsen, C. E. y Møller, B. L. (2000). The distribution of covalently bound phosphate in the starch granule in relation to starch crystallinity. *Biological Macromolecules*, 27, 211-218.
- Boquet R., Chirife J., y Iglesias H.A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods. II. Evaluation of various two-parameters models. *Journal of Food Technology*, 13, 319-327.
- Bown, G. (2003). Developments in conventional heat treatment. En Zeuthen, P. y Bøgh-Sørensen, L. *Food preservation techniques*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Branen, A. L. (1993). Introduction to use of antimicrobials. En *Antimicrobials in food*, 2nd ed. Davidson M. y Branen A., M. Dekker Inc. New York.
- Braverman, J. B. (1967). Introduction to biochemistry of foods. Elsevier Publishing Company, Nueva York.
- Brooker, D. B., Bakker-Arkema, F. W. y Hall, C. W. (1974). *Drying cereal grains*. AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, U.S.A.
- Brouns, F. y Dye, L. (2004). Starch: physical and mental performance. En Eliasson, A-C. (ed.) *Starch in foods. Structure, function and applications*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Buonocore, G.G., Del Nobile, M.A., Panizza, A., Bove S., Battaglia G. y Nicolais L. (2003a). Modeling the Lysozyme. Release Kinetics from Antimicrobial Films Intended For food Packaging Applications, *Journal of Food Science*, 68(4), 1365-1370.
- Buonocore G.G., Del Nobile M.A., Panizza A., Corbo M.R., y Nicolais L. (2003b). A general approach to describe the antimicrobial agent release from highly swellable films intended for food packaging applications. *Journal of Controlled Release*, 90, 97-107.
- Bureau, G. (1996). Packaging and microbiology. En G. Bureau, y J.L. Multon, *Food packaging technology*, Volume 1, pp 47-56. Wiley-VCH Inc., New York, USA.
- C.A.A. Código Alimentario Argentino (2006). Disponible en: www.anmat.gov.ar/principal.htm
- Cagri, A., Ustunol, Z. y Ryser, E.T. (2001). Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids, *Journal of Food Science*, 66(6), 865-870.
- Campos, C. A., Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N. (2000). Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 117-122.
- Campos, C. A., Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N. (1997). Sorbate destruction and non-enzymatic browning in model aqueous systems. *Food Science and Technology International*, 3(6):405-411.

- Campos, C. A. (1995). Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Capello, B., De Rosa, G., Giannini, L., La Rotonda, M. I., Mensitier, G., Miro, A., Quaglia, F. y Russo, R. (2006). Cyclodextrin-containing poly(ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: Potencial as buccal delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. In Press.
- Castellan, G. W. (1971). *Physical Chemistry*, 2^oed. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, U.K.
- Castro, M.P., Garro, O., Gerschenson, L. N. y Campos, C.A. (2003). Interactions between potassium sorbate, oil and Twin 20: its effect on the growth and inhibition of *Z. bailii* in model salad dressings. *Journal of Food Safety*, 23, 47-59.
- Castro, M.P., Garro, O., Campos, C.A. y Gerschenson, L. N. (2002). Interactions between additives: its effect on sorbate stability and *Z. Bailii*. Minimum Inhibitory concentration in model aqueous systems resembling salad dressings. *Food Science and Technology International*, 8 (1), 33-39.
- Cha, D.S., Cooksey, K., Chinnan, M.S. y Park, H.J. (2003). Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 209-213.
- Che, S.Y. y Rhee, C. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relative to mechanical properties. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35, 151-157.
- Cheftel, J-Cl; Cheftel, H. y Besancon, P. (1983). Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Vol. II. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Chen, M-C., Yeh, G. H-C. y Chiang, B-H. (1996). Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 379-390.
- Cheng, L., Moghraby, J. y Piper, P. W. (1999). Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 89-95.
- Chichester, D. F. y Tanner, F. W. (1975). Antimicrobial Food Additives. En: *Handbook of food additives*. Ed. T. E. Furia. CRC Press, Cleveland.
- Chien, P-J., Fuu, S. y Yang, F-I. (2005). Effects of edible chitosa coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, in press.
- Choi, J. H., Choi, W. Y., Chinnan, M. J., Park, H. J., Lee, D. S. y Park, J. M. (2005). Diffusivity of potassium sorbate in κ -carrageenan based antimicrobial film. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38, 417-423.
- Chung, D., Papadakis S. E. y Yam, K. L. (2001). Release of propyl paraben from a polymer coating into water and food simulating solvents for antimicrobial packaging applications. *Journal of Food Processing and Preservation*, 25, 71-87.

- Cid Cárcamo, E. (1981). Cinética de disolución de medicamentos. Monografía nº24 Organización de los Estados Americanos, Washington DC, USA.
- Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., O'Riordan, E. D. y O'Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43, 25-30.
- Crank, J. (1956). *Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press., London, G. B.
- Cuppett, S. L. (1994). Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonists. En Krochta, J.M., Baldwin, E. y Nisperos-Carriedo, M.O. *Edible films and coatings to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
- David, M. A. (1996). *Glycerol: A Jack Of All Trades*. George S. Henry Academy, North York (Toronto), Ontario. Disponible en www.chem.yorku.ca/hall_of_fame/essays96/glycerol.htm
- Davidson, P. M. y Zivanovic S. (2003). The use of naturals antimicrobials. En Zeuthen, P. y Bøgh-Sørensen, L. (Ed.). *Food preservation techniques*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Davidson, P. M., Juneja, V. K. y Branen, J. K. (2002). Antimicrobial agents. En *Food Additives 2nd ed*. Marcel Dekker, Inc. New Cork.
- Davidson, P. M. y Branen, A. L. (1993). *Antimicrobials in foods*, 2º ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Dawson, P.L., Hirt, D.E., Rieck, J.R., Acton, J.C. y Sotthibandhu, A. (2003). Nisin release from films is affected by protein type and film-forming method. *Food Research International*, 36, 959-968.
- De Bernardi, L. A. (2002). Fécula de Mandioca. Disponible en www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/horta/Fecula-Mandioca/Fecula_Mandioca_01.htm
- Del Nobile M.A., Mensitieri G., Netti P.A., y Nicolais L. (1994). Anomalous diffusion in poly-ether-ether-ketone (PEEK), *Chemical Engineering Science*, 49(5), 633-644.
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A. y Galotto, M. J. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91, 751-756.
- Delville, J., Joly, C., Dole, P. y Biliard, C. (2003). Influence of photocrosslinking on the retrogradation of wheat starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 53, 373-381.
- Demirgöz, D., Elvira, C., Mano J., Cunha, A. M., Piskin, E. y Reis, R. L. (2000). Chemical modification of starch based biodegradable polymeric blends: effects on water uptake, degradation behaviour and mechanical properties. *Polymer degradation and stability*, 70, 161-170.
- Desai, K. G. H. (2005). Preparation and characteristics of high-amylose corn starch/pectin blend microparticles: A technical note. *AAPS Pharm. Sci and Tech.*, 6(2) 202-208.

- Devece, C., Rodriguez-Lopez, J., Fenoll L., Tudela J., Catala J., de Los Reyes E. y Garcia-Canovas F. (1999). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4506-11.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. y Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. y Montville, T. J. (1997). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D. C.
- Duckova, K., y Mandak, M. (1981). Interaktion modifizierter staken mit sorbinsaure. *Pharmazie*, 36, H9, 634-635.
- Dumoulin Y., Serge A., Szabo P., Cartilier L., y Mateescu M. A. (1998). Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis. *Carbohydrate Polymer*, 37, 361-370.
- Dunn, J., Clark, R., Asmus, J., Pearlman, J., Boyer, K., Painchaud, F. y Hofmann, G. (1989). *Methods for preservation of foodstuffs*, U.S. Patent 4871559.
- Durango A. M., Soares N. F. F. y Andrade N. J. (2004). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, in press.
- Dutta, D., Dutta, A., Raychaudhuri, U. y Chakraborty, R. (2006). Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, 76, 538-546.
- Eklund, T. (1985). The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. of Gen. and Microbiol.*, 131, 73-76.
- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 383 - 389.
- Eklund, T. (1980). Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 423-432.
- Escalada Pla, M. F. (2006). *Caracterización, procesamiento y optimización del aprovechamiento industrial de la calabacita (Cucurbita moschata, Duchesne ex Poiret)*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Fabech, B., Hellstrøm, T., Henrysdotter, G., Hjulmand-Lassen, M., Nilsson, J., Rüdinger, L., Sipiläinen-Malm, T., Solli, E., Svensson, K., Thorkelsson, A. y Tuomaala, V. (2000). *Active and Intelligent Food Packaging. A Nordic report on the legislative aspects*. Nordic co-operation, <http://www.norden.org/pub/ebook/2000-584.pdf>
- Famá, L. (2004). Producción y caracterización de películas comestibles usadas como recubrimientos de alimentos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S. y Gerschenson, L. N. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38, 631-639.

- Fanta, G. F., Shogren, R. L. y Salch, J. H. (1999). Steam jet cooking oh high amylose starch-fatty acid mixtures. An investigation of complex formation. *Carbohydrate polymers*, 38, 1-6.
- FAO (2004). Food and Agriculture Organization. *Proceedings of the validation forum on the global cassava development strategy. Volume 6. Global cassava market study business opportunities for the use of cassava*. Rome: International fund for agricultural development. Roma, Italia.
- FAO/WHO (1973). 17ª JECFA. Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Roma, Italia.
- Fellows, P. (1994). Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y Prácticas. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Ferry, J. D. (1980). Viscoelastic Properties of Polymers, 3ª ed. cap. 11. J. Wiley y Sons, Nueva York.
- Finol, M.L., Marth, E.H. y Lindsay, R.C. (1982). Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *Journal of Food Protection*, 45, 398-404.
- Flint, O. (1996) *Microscopía de los alimentos. Manual de métodos prácticos utilizando microscopía óptica*. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.
- Franssen, L. R. y Krochta, J.M. (2003). Edible Coatings containing natural antimicrobials for processed foods. En Soller, S. (ed) *Naturals antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA
- Franssen, L. R., Rumsey, T.R. y Krochta, J.M. (2002). Modeling of natamycin and potassium sorbate diffusion in whey protein isolate films for application to cheddar cheese. Poster 28-5. Anaheim, California: Institute of Food Technologists Annual Meeting.
- Garcia, M., Martino, M. y Zaritzky, N. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65, (6), 941-947.
- Garcia, M., Martino, M. y Zaritzky, N. (1998). Plasticized starch based coatings to improved strawberry (*Fragaria ananassa*) quality and stability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46 (9), 3758-3767.
- Geankoplis, C. (1999). Procesos de transporte y operaciones unitarias. 3º edición, Ed. CECSA, México.
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L. y Krochta J. M. (1994). Edible coatings and films base on proteins. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (201-277). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- Gennadios, A., Weller, C. L. y Gooding, C. H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.

- Gerschenson, L. N. y Campos, C. A. (1995). Sorbic Acid Stability during Processing and Storage of High Moisture Foods. En Barbosa-Cánovas, G. y Welte-Chanes, J. *Food preservation by moisture control. Fundamentals and applications*. (pp.761-790). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. Inc.
- Geveke, D. y Brunkhorst, C. (2003). *Journal of Food Protection*, 66(9), 1712-1715.
- Giannakopoulos, A. y Guilbert, S. (1986). Determination of sorbic acid diffusivity in model food ges. *Journal of food technology*. 21, 339-353.
- Gliemmo, M. F., Campos, C. A. y Gerschenson, L. N. (2004). Effect of sweet humectants on stability and antimicrobial action of sorbates. *Journal of Food Science*, 69, (2), 39-44.
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Roge, B. y Mathlouthi, M. (2005). Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*, in press.
- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J-L. (1992). Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190-199.
- Goodshall, M. y Solms, J. (1992). Flavor and sweetener interactions with starch. *Food Technology*, 6, 140-145.
- Greener Donhowe, I. y Fennema, O. (1994). Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and Testing Methods. En J.M. Krochta, E. Baldwin y M.O. Nisperos-Carriedo, *Edible films and coatings to improve food quality*, (pp.1-24). Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. Inc.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal Research of the National Bureau of Standards. A- Physics and Chemistry*, 81 A (1), 89-96.
- Guerzoni, M. E., Gardini, F. y Duan, J. (1990). Interactions between inhibition factors on microbial stability of fruity-based systems. *Int. Journal of Food Microbiology*, 10, 1-18.
- Guilbert S. (1988). Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: Application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. En Seow C. C. *Food Preservation by Noisture Control* (pp. 199-219). Essex, Elsevier Applied Science Publishers Ltd., England.
- Guilbert S. y Biquet B. (1996). Edible films and coatings. En Bureau G. y Multon J. L. *Food packaging technology*, Volume 1 (pp. 315-353). Wiley-VCH Inc., New York, USA.
- Guilbert, S., Giannakopoulos, A. y Cheftel, J. C. (1985). Diffusivity of sorbic acid in food gels at high and intermediate water activities. En Simatos, D. y Multon J. L. *Properties of water in foods*. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- Han, J. H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food technology* 54 (3) 56-65.
- Han, J. H. y Floros, J. D. (1198a). Potassium sorbate diffusivity in american processed and mozaarella cheeses. *Journal of Food Science*, 63(3), 435-437.

- Han, J. H. y Floros, J. D. (1988). Simulating diffusion model and determining diffusivity of potassium sorbate through plastics to develop antimicrobial packaging films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 107-122.
- Hayashi, R. (2002). Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology. Elsevier. Series: *Progress in Biotechnology*, London, U.K.
- Hermans, P.H. y Weidinger, A. (1961). On the determination of the crystalline fraction of polyethylenes from X-ray diffraction. *Makromolekulare Chemie*, 44-46, 24-36.
- Hernández E. (1994). Edible coatings from lipids and resins. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 89-104). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- Hoseney, R. C. (1991). *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Howard, L. R. D. T. (1996). Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of mini-peeled carrots. *Journal of Food Science*, 61, 643-651.
- Huhtanen, C. N. y Feinberg, J. (1980). Sorbic acid inhibition of *Clostridium botulinum* in nitrite-free poultry frankfurters. *Journal of Food Science*, 45, 453-460.
- Ivey, F.J. y Robach, M. C. (1978). Effect of sorbic acid and sodium nitrite on *Clostridium botulinum* outgrowth and toxin production in canned comminuted pork. *Journal of Food Science*, 43, 1782-1786.
- Jangchud, A. y Chinnan M. S. (1999). Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32, 89-94.
- Jeffrey, G. A. (1996) Hydrogen bonds and molecular recognition. *Food Chemistry*, 56 (3), 241-246.
- Joshi, P. y Brimelow, C. J. B. (2002). Colour measurement of foods by colour reflectance. En MacDougall, D. B. *Colour in food. Improving quality*. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.
- Juven, R. (1976). Bacterial spoilage of citric products of pH lower than 3,5. *J. Milk Food Technol.*, 39, 819-823.
- Kennedy, C. (2003). Developments in freezing. En Zeuthen, P. y Bøgh-Sørensen, L. *Food preservation techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Kester, J.J. y Fennema O.R. (1989). An edible film of lipids and cellulose ethers: Barrier properties to moisture vapor transmission and structural evaluation. *Journal of Food Science*, 54 (6), 1383-1389.
- Kester, J.J. y Fennema O.R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, december, 47-59.
- Khandelwal, G. D. y Wedzicha, B. L. (1990). Nucleophilic reactions of sorbic acid. *Food additives and Contaminants*, 7, 685-689.

- Kim, S. J. y Ustunol, Z. (2001). Sensory attributes of whey protein isolate and candelilla wax emulsion edible films. *Journal of Food Science*, 66, 909-911.
- Kinderlerer, J. y Hatton, P. (1990). Fungal metabolites of sorbic acid. *Food additives and Contaminants*, 7, 657-669.
- Kinsella, J. E. y Fox, P. F. (1986). Water sorption by proteins: milk and whey proteins. Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, 24 (2), 91-139.
- Knerr, T., Lerche, H., Pischetsrieder, M. y Severin, T. (2001). Formation of a novel colored product during the Maillard reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1966-1970.
- Krochta, J. M., Baldwin, E. y Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). *Edible films and coatings to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
- Kurtis Villwok. V., Eliasson, A-C., Silverio, J. y BeMiller, J. (1999). Starch-lipid interactions in common, waxy, *ae du*, and *ae su2* maize starches examined by differential scanning calorimetry. *Cereal Chemistry*, 76 (2), 292-298.
- Kurup, T.R.R., Wan, L.S.C. y Chan, L.W., (1991). Availability and activity of preservatives in emulsified systems. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 66, 3, 76-82.
- Kurup, T. R. R., Wan, L. S. y Chan, L. W. (1995). Interaction of preservatives with macromolecules: Part II - Cellulose derivatives. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70, 187-193.
- Labuza, T. P., Acott, K, Tatini, S. R., Lee, R. Y., Flink, J. y McCall, W. (1976). Water activity determination: a collaborative study of different methods. *Journal of Food Science*, 41, 910-917.
- Lazarides, H. N., Nickolaidis, A. y Katsanidis, E. (1995). Sorption changes induced by osmotic preconcentration of apple slices in different osmotic media. *Journal of Food Science*, 60(2), 348-350 y 359.
- Leistner, L. (1995). Use of hurdle technology in food processing: recent advances. En Barbosa Cánovas, G., Welti Chanes, J. *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. (pp. 377-396). Lancaster, echnomic Publishing Co., Pennsylvania.
- Leistner, L. y Gorris, G. M. (1995). Food preservation by combined processes. Final report FLAIR concerted action No. 7, Subgroup B. EUR 15776 EN/ISBN 90-900-7303-5.
- Lenovich, L. M., Buchanan, R. L., Worley, N. J. y Restaino, L. (1988). Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Food Science*, 53(3), 914-916.
- Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M. A., Delmas-Petterson, G., Yu H.-L. y Lacroix, M. (2000). Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5566-5575.

- Li, F. y Larock, R. (2001). New soybean oil-styrene-divinylbenzene thermosetting copolymers. III. Tensile stress-strain behavior. *Journal of Polymer Science. Part B: Polymer Physics*, 39, 60-77.
- Li, Z., Zhuang, X. P., Liu, X. F., Guan, Y. L. y De Yao, K. (2002). Study on antibacterial O-carboxymethylated chitosa/cellulose blend film from LiCl/N, N-dimethylacetamide solution. *Polymer communication*, 43, 1541-1547.
- Liewen, M. B. y Marth, E. H. (1985). Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. *Journal of Food Protect*, 48,364-370.
- Liu, Q. (2005). Understanding Starches and Their Role in Foods. En *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Lozano, R. D. (1978). El color y su Medición. 1ra. Edición. Editorial América, Bs. As., Argentina.
- Lück, E. y Jager, M. (2000). Ácido Sórbico. En *Conservación Química de los Alimentos. Características, usos, efectos*. Ed. Acibia. Zaragoza, España.
- Lück, E. (1993). Sorbic Acid. En *Ulmans Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A24, 5ª edición. VCH Publishers, Weinheim, Alemania, 507-513.
- Lueck, E. (1976). Sorbic acid as a food preservative. *International Flavors Food Additives*, 7,122-127.
- Mano, J. F. y Viana, J. C. (2001). Effects of the strain rate and temperature in stress-strain tests: study of the glass transition of a polyamide-6. *Polymer Testing*, 20, 937-943.
- Manzocco, L., Nicoli, M.C. y Labuza, T. (2003). Study of bread staling by X-ray diffraction analysis. *Italian Food Technology*, XII (31), 17-23.
- Martinez, V. Y. (2005). Alteraciones microestructurales y ultraestructurales de tejidos vegetales mínimamente procesados. Impacto en las características mecánicas. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Martoadiprawito, W. y Whitaker, J.R. (1963). Potassium sorbate inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 77, 536-544.
- Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and stability of foodstuffs. *Food Control*,12, 409-417.
- McHugh T. H. y Krochta J. M. (1994). Permeability properties of edible films. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (pp 139-187). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- McHugh T. H. y Senesi E. (2000). Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65(3), 480-485.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. y Ratkowsky, D. A. (1993). *Predictive microbiology: theory and application* (pp. 11-86). Research Studies Press Ltd. England.

- Meléndez-Martínez, A. Vicario, M. I. y Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *ALAN (on line)*, 54(2), 209-215. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-0622220040000200011&lng=es&nrm=iso
- Mellenthin, W. M., Chen, P. M. y Borgic, D. M. (1982). In-line application of porous wax coating materials to reduce friction discoloration of “barlett” and “d’ Anjou” pears. *Hort Science*, 17, 215-225
- Menegalli, F., Sobral, P., Roques, M. y Laurent, S. (1999). Characteristics of gelatin biofilms in relation to drying process conditions near melting. *Drying Technology*, 17, 1697-1706.
- Mossel, D. A. A. y Moreno García, B. (1985). Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P. y Mateescu, M. A. (2004). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release II. Swelling properties and mechanistic study. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 231-238.
- Mulhbacher, J. y Mateescu, M. A. (2005). Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release III. Diffusion properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 297, 22-29.
- Namiki, M., Qsawa, T., Kada, T., Tsuju, K. y Namiki, K. (1983). Formation of C-nitro and C-nitroso mutagens by the reaction of nitrite with sorbic acid and its analogues and their inactivation with foods constituents. *Carcinogens Mutagens Environmental*, 3, 109-112.
- Nielsen L. E., (1962). Mechanical Properties of Polymers, Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
- Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). Edible coatings and films base on polysaccharides. En J. M. Krochta, E. A. Baldwin, M. O. Nisperos-Carriedo, *Edible coatings and films to improve food quality* (pp.305-335). Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc.
- Ofman, M., Campos, C. y Gerschenson, L. (2004). Effect of preservatives on the functional properties of tapioca starch: Analysis of interactions. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 355-361.
- Ozdemir M. y Floros, J. D. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films *Journal of Food Engineering*, 47, 149-155.
- Padgett, T., Han, I. Y. y Dawson, P. L. (2000). Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *Journal of food processing and preservation*, 24, 423-432.
- Padgett, T., Han, I. Y. y Dawson, P. L. (1998). Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of food protection*, 61 (10)1330-1335.
- Park, S. L., Daeschel, M. A. y Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan films. *Journal of Food Science*, 69(8), 215-221.

-
- Park, H. J. (2003). Edible coatings. En *Food preservation techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Park, H. S. y Marth, E. H. (1972). Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *J.f Milk Food Technol.*, 35, 532-539.
- Pederson, M., Albury, N. y Christiansen, M. D. (1961). The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. IV. Fungistatic effects of organic acids. *Applied Microbiology*, 9, 162-164.
- Penfield, M. P. y Campbell, A. M. (1990). Evaluating Food by Objective Methods. En *Experimental food science*. (pp. 23-50). Academic Press Inc. Nueva York. U.S.A.
- Pethybridge, A.D., Ison, R.W. y Harrigan, W.F. (1983). *Journal of Food Technology*, 18, 789-796.
- Polyakova, A., Stepanov, E. V., Sekelik, D., Schiraldi, D. A., Hiltner, A. y Baer, E. (2001). Effect of crystallization on oxygen-barrier properties of copolyesters based on ethylene terephthalate. *Journal of polymer science. Part B. Polymer physics*, 39(16), 1911-1919.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K. y Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38(8), 859-865.
- Praphailong, W. y Fleet, G.H. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14, 459-468.
- Reineccius, G. A. (1994). Flavor encapsulation. En *Edible films and coatings to improve food quality*. Krochta, J.M., Baldwin, E. y Nisperos-Carriedo, M.O. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
- Restaino, L., Lenovich, L. M. y Bills, S. (1982). Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *Journal of Food Protection*, 45, 1138-142.
- Rico-Peña, D. C. y Torres, J. A. (1991). Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *Journal of Food Science*, 56, 497-499.
- Rindlav, Å., Hulleman, S.H.D. y Gatenholm, P. (1997). Formation of starch films with varying crystallinity. *Carbohydrate polymers*, 34, 25-30.
- Rindlav-Westling, Å., Stading, M., Hermansson, A. M. y Gatenholm, P. (1998). Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate polymers*, 36, 217-224.
- Ripoche, A. C., Chollet, E., Peyrol, E. y Sebti, I. (2006). Evaluation of nisin diffusion in a polysaccharide gel: influence of agarosa and fatty content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, in press.
-

- Robach, M.C. y Stateler, C.L. (1980). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole or ethylenediamine tetraacetic acid. *J. Food Prot.* 43, 208-213.
- Roberts, J., Walker, L. y Anderson, J. (2004). Institute of Food Technologists Annual Meeting, Las Vegas, NV. Presentación 67C-32. Disponible en www.uga.edu/nchfp/papers/2004/04ift-yellowsquashabstract.pdf
- Roberts, T. A., Gibson, A. M. y Robinson, A. (1982). Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. III. The effect of potassium sorbate. *Journal of Food Technology*, 17, 307-311.
- Rockland, L. B. y Stewart, G. (1981). Water activity: Influence on food quality. Academic Press. Nueva York, U.S.A.
- Rosenthal, A. J. (1999). *Food Texture*. Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Rojas, A. M. (1995). Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Roy, S., Welle, C.L., Gennadios, A., Zeece, M.G. y Testin, R.F. (1999). Physical and Molecular properties of wheat gluten films cast from heated film-forming solutions. *Journal of Food Science*, 64(1), 57-60.
- Saguy, I., Goldman, M. y Karel, M. (1985). Prediction of beta-carotene decolorization in model system under static and dynamic conditions of reduced oxygen environment. *Journal of Food Science*, 50, 526-530.
- Seker, M. y Hanna, M. (2005). Sodium hydroxide and trimetaphosphate levels affect properties of starch extrudates. *Industrial crops and products*, in press.
- Seo, J. S., Burri, B. J., Quan, Z. y Neidlinger, T. R. (2004). Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal of chromatography A*. 1073, 371-375.
- Seow, C. C. y Cheah, P. B. (1985). Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions. *Food Chemistry*, 17:95.
- Seward, R. A., Deibel, R. H. y Lindsay, R. C. (1982). Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in microcultures. *Applied of Enviromental of Microbiology*, 44, 1212-1415.
- Shepherd, H. y Bhardwaj, R. K. (1986). A study of the desorption isotherms of rewetted pigeon pea type 17. *Journal of Food Science*, 51(3), 595-598.
- Siepmann, J., Lecomte, F. y Bpodmeier, R. (1999). Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. *Journal of controlled release*, 60, 379-389.
- Silverstein, M. R., Bassler, G. C. y Morrill, T. C. (1991). Spectrometric identification of organic compounds. 5° ed. John Wiley & sons, Inc., New York, U.S.A.
- Smittle, R. B. y Flowers, R. S. (1982). Acid-tolerant microorganisms involved in spoilage of salad dressings. *Journal of Food Protection*, 45, 977-980.

- Smoot, L. A. y Pierson, M. D. (1981). Mechanisms of sorbate inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination. *Applied Environmental Microbiology*, 42, 477-480.
- Sofos, J. N. (1989). *Sorbate Food Preservatives*. Academic Press, Florida.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. (1983). Sorbates. En Branen, A. L. y Davidson, P. M. *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker, New York, U.S.A.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*, 44,614-620.
- Sokal, R. R. y Rohlf, J. B. (2000). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, W. H. Freeman and Company, California, U.S.A.
- Stannett, V. (1968). Simple Gases. En Crack, J. y Park, G. S. *Diffusion in polymers* (pp. 40-73). Academic Press Inc., Londres, U.K.
- Stiles Battey, A., Duffy, S. y Schaffner, D. (2002). Modelling yeast spoilage in cold filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1901-1906.
- Sümnü, G. y Bayindirli, L. (1995). Effects of coatings on fruit quality of Aaasya Apples. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28(5), 501-505.
- Svorcova, L. (1980). Effect of ascorbic acid, potassium sorbate and the pH on nonsporulating bacteria in nonalcoholic beverages. *Chem. Abs.*, 92, 4825-4830.
- Tapia de Daza, M.S Argaiz, A, Lopez Malo y Dias R V. (1995). Microbial stability assesment in high and intermediate moisture foods: special emphasis on fruit products. En Barbosa-cánovas G. y Welte-Chanes J. *Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications*. Technomic Publishing Co., Lancaster, U.S.A.
- Thakur, B. R. y Arya, S. S. (1991). Role of sorbic acid in non-enzymatic browning in liquid and solid model food systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 26,157-161.
- Thomas D.S. y Davenport, R.R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol*, 2, 157-169.
- Torres, J. A., Motoki, M. y Karel, M. (1985). Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. I. Control of surface preservative concentration. *Journal of Food Processing Preservation*, 9, 75-78.
- Trezza, T. A. y Krochta, J. M. (2000). Color stability of edible coatings during prolonged storage. *Journal of Food Science*, 65(1), 1166-1169.
- Van den Berg, C. y Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. En Rockland L. B. y Stewart G. F. *Water activity: Influences on Food Quality* (pp.1-61). Academic Press, New York. U.S.A.
- Varzakas, T. H., Leach, G. C., Israilides, C. y Arapoglou, D. (2005). Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods. *Enzyme and microbial technology*, 37, 29-41.

- Veiga, A. y Madeira-Lopes, A. (2000). Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast *Pichia membranifaciens* in a commercial apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 56, 145-151.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., de Kruijf, N. y Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 77-86.
- Vodjani, F. y Torres, J. A. (1990). Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose films: effect of fatty acids. *Journal of Food Science.*, 55, 841 -846.
- Vodjani, F., y Torres, J. A. (1989a). Potassium sorbate permeability of polysaccharide films: chitosan, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. *Journal of Food Processing and Engineering*, 58, 33-48.
- Vodjani, F., y Torres, J. A. (1989b). Potassium sorbate permeability of edible cellulose ether multi-layer films: effect of fatty acids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 417-430.
- Wallhäüßer, K.H. y Lück, E. (1970). Der Einfluß der Sorbinsäure auf mycotoxinbildende Pilze in Lebensmitteln. *Dtsch Lebensm Rundsch* 66, 88-92.
- Ward I. M. (1985). *Mechanical Propierties of Solid Polymers*, 2º ed., por Wiley & Sons, E.U.A.
- Warth, A. D. (1977). Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 215-230.
- Wedzicha, B.L. y Ahmed, S., (1994). Distribution of benzoic acid in an emulsion. *Food Chemistry*, 50, 9-11.
- Wedzicha, B. L. y Zeb, A. (1991). Catalysis of the sorbic acid - thiol reaction by bovine serum albumin. *International Journal of Food Science Technology*, 26, 381-385.
- Wedzicha, B.L., Zeb, A. y Ahmed, S. (1988). Distribution of low-molecular weight food additives in dispersed systems. En Dickinson, E. y Stainsby, G. *Advances in Food Emulsions.*, Elsevier, Londres, G.B.
- Walti-Chanes, J., Mújica-Paz H., Valdez-Fragoso A. y León-Cruz, R. (2003). Fundamentals of Mass Transport. En *Transport Phenomena in Food Processing*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Welty, J., Wicks, C. y Wilson, R. (1999). Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa. 2º ed., Ed. Limusa, México.
- White, P. J. y Tziotis, A. (2004). New corn starches. En *Starch in food. Structure, function and applications*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA

- Wong, D. W., Camirand, W. M. y Pavlath A. E. (1994). Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. En Krochta, J. M., Baldwin, E. y Nisperos-Carriedo, M. O. *Edible films and coatings to improve food quality*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA.
- Wu, H.C.H. y Sarko, A. (1978). The double-helical molecular structure of crystalline A-amylose. *Carbohydrate Research*, 61, 27-40, 1978.
- Xie, S. X., Liu, Q. y Cui, S. W. (2005). Starch Modification and Applications. En *Food Carbohydrates. Chemistry, physical properties and applications*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Yang, L. y Paulson, A.T. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 563-570.
- York, G.H. y Vaughn, R.H. (1964). Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. *Journal of Bacteriology*, 88, 411-417.
- Zactiti, E. M. y Kieckbusch, T. G. (2005). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of food engineering*, in press.
- Zeuthen, P. y Bøgh-Sørensen, L. (2003). *Food preservation techniques*. CRC Press, Boca Ratón, FL, USA.
- Zobel, H. F. (1994). Starch granule structure. En Alexander R. J. y Zobel H. F., *Developments in carbohydrate chemistry* (pp. 1-36). The American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, U.S.A.