



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**Desarrollo de películas y recubrimientos comestibles
compuestos como soporte de antimicrobianos
naturales: caracterización y aplicaciones**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Industrial

Ing. Sofía Berti

Directora de tesis: Dra. Flores, Silvia Karina

Co-Directora de tesis: Dra. Jagus, Rosa Juana

Consejera de estudios: Dra. Sandra Guerrero

Lugar de trabajo: INTECIN (CONICET-UBA), Departamento de Ingeniería Química
FIUBA
ITAPROQ (CONICET-UBA), Departamento de Industrias
FCEN-UBA

Ciudad de Buenos Aires, 6 de julio de 2023

Desarrollo de películas y recubrimientos comestibles compuestos como soporte de antimicrobianos naturales: caracterización y aplicaciones

Resumen

En esta investigación se desarrollaron recubrimientos y películas comestibles a base de almidón de mandioca, activos y reforzados, utilizando las técnicas de casteo o termo-compresión, y se estudiaron sus propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímicas y antimicrobianas. Mediante la técnica de casteo, se estudió la adición de diferentes cantidades de salvado de arroz procesado (PRB) y expeller de soja sonicado (SSE) como refuerzos, y se formularon películas con y sin natamicina y nisina. Las películas con 0,2% p/p de PRB mostraron mayor esfuerzo y deformación a la ruptura y menor solubilidad en agua. A su vez, se optimizaron los niveles de glicerol y SSE para la obtención de una película con un máximo esfuerzo y mínima solubilidad. Tanto las películas como los recubrimientos activos y reforzados mostraron la disponibilidad de los antimicrobianos, actuando sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*, y demostrando su eficacia para controlar una contaminación externa en queso Port Salut. Adicionalmente, se observó que las películas con SSE se biodegradaron luego de siete días en compost. A fin de estudiar procesos escalables, se elaboraron películas por termo-compresión y se compararon sus características con las correspondientes a los sistemas obtenidos por casteo. Las películas casteadas fueron más transparentes, resistentes a la ruptura y deformables mientras que las termoformadas fueron menos permeables al oxígeno, con menor humedad y presentaron una estructura de la matriz más homogénea. Todas las películas desarrolladas resultaron con buenas propiedades para ser utilizadas como envase activo para la conservación de alimentos. Esta tesis representa un aporte al conocimiento sobre tecnologías de obtención y determinación de características y propiedades de materiales alternativos de empaquetamiento de alimentos que sean respetuosos con el medio ambiente.

Palabras Claves: películas y recubrimientos comestibles compuestos, almidón de mandioca, natamicina, nisina, salvado de arroz, expeller de soja, cultivo mixto, casteo, termo-compresión, propiedades fisicoquímicas, protección antimicrobiana.

Development of composite edible films and coatings containing natural antimicrobials: characterization and applications

Abstract

In this research, active and reinforced cassava starch-based edible coatings and films were developed using either casting or thermo-compression techniques, and their structural, mechanical, physicochemical, and antimicrobial properties were studied. Using the casting technique, the addition of different amounts of processed rice bran (PRB) and sonicated soybean expeller (SSE) as reinforcements was studied and films with and without natamycin and nisin were formulated. Films with 0.2% w/w PRB showed higher stress and strain at break and lower solubility in water. In turn, the levels of Glycerol and SSE were optimized to obtain a film with maximum stress and minimum solubility. Both active and reinforced films and coatings showed the availability of antimicrobials acting on *Saccharomyces cerevisiae* and *Listeria innocua* and demonstrated their efficacy in controlling external contamination in Port Salut cheese. Additionally, it was observed that SSE films biodegraded after seven days in compost. To study scalable processes, films were produced by thermo-compression and their characteristics were compared with those of systems obtained by casting. The cast films were more transparent, tear resistant and deformable, while the thermoformed films were less permeable to oxygen, had lower moisture content and presented a more homogeneous matrix structure. All the films developed present good properties to be used as active packaging for food preservation. This thesis represents a contribution to the knowledge of technologies for obtaining and determining the characteristics and properties of alternative food packaging materials that are environmentally friendly.

Key words: edible composite films and coating, cassava starch, natamycin, nisin, rice bran, soybean expeller, mixed culture, casting, thermo-compression, physicochemical properties, antimicrobial protection.

Agradecimientos

- ❖ A mis Directoras, Silvia Flores y Rosa Jagus, por guiarme, aconsejarme, escucharme y apoyarme constantemente y por brindarme gran parte de sus conocimientos. Por confiar en mí para realizar cada ensayo y por el gran esfuerzo que hicieron día a día revisando cada resultado, ensayo y escrito presentado hasta la tesis final.
- ❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad de Buenos Aires.
- ❖ A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por abrirme sus puertas y permitir mi formación de Doctorado.
- ❖ A Carolina, Verónica, Victoria, Julia, Gabriel, Pablo, Cintia, Yanina, Antonella y Marcia por compartir conmigo el lugar de trabajo, charlas y risas, almuerzos, investigaciones y curiosidades. Por darme un cálido espacio y dejarme formar parte del Instituto de Tecnologías y Ciencias de la Ingeniería (INTECIN) y del Laboratorio de Investigación en Tecnología de Alimentos (LITA).
- ❖ A l@s chic@s del Laboratorio de Optimización de la Calidad de Alimentos Preservados-LOCAP por compartir el espacio, congresos, jornadas y afters.
- ❖ A mis compañer@s de Procesamiento de Alimentos de la Planta Piloto y de Operaciones Unitarias I con quienes encontré nuevos desafíos siendo docente.
- ❖ A la gente del PINMATE por su ayuda y colaboración en los ensayos.
- ❖ A los no docentes del Pabellón de Industrias.
- ❖ A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por el otorgamiento de la Beca de movilidad entre instituciones asociadas que me permitió realizar un intercambio de investigación. A Chelo González, Carolina Cantreras y l@s chic@s de la Universidad Politécnica de Valencia por recibirme y darme una cálida bienvenida y enseñarme a usar nuevos equipos en un nuevo espacio y por la gran experiencia internacional compartida.
- ❖ A mi casi siamesa y compañera de locuras, Natalia, por ser mi mejor amiga y estar la una para la otra en las buenas y no tan buenas, para apoyarnos y descargar un día agitado, pero también planear viajes inolvidables.

- ❖ A mi gran amigo de la adolescencia, Ary, por volvernos a encontrar y hablarnos como si fuera ayer que no nos vimos. Por completar las ideas del otro y por aconsejarnos con las palabras justas.
- ❖ A mi familia porque sin ellos llegar hasta acá no hubiera sido posible. Por su enorme confianza, por su paciencia, por su aliento y por aguantarme e intentar comprenderme.
- ❖ A mi mamá, Norma, por todo. Por ser una mujer fuerte y por permitirse ser feliz.
- ❖ A mis hermanos, Pamela e Ignacio, por ser ellos y, cada uno con su personalidad, complementarnos siendo un trío dinámico.
- ❖ A mi tía, Claudia, y mis primos, Agustín y Guido, por brindarme un segundo hogar y por intentar comprender un poquito de lo que hago día a día.
- ❖ A Verónica y las chicas de Zumba® por bailar, descargar y divertirnos juntas.
- ❖ A todos los que están ahí siendo parte de mí y que contribuyeron con mi crecimiento profesional y personal.

“Nunca se debe gatear cuando se tiene el impulso de volar” Hellen Keller.

ÍNDICE

Resumen	ii
Abstract	iii
Agradecimientos	iv
ÍNDICE	1
Glosario	8
CAPÍTULO 1	13
Introducción general: Tecnologías de preservación de alimentos, películas y recubrimientos comestibles compuestos	13
1.1 Tecnología de preservación de alimentos	14
1.2 Tratamientos físicos térmicos y no térmicos	15
1.3 Tratamientos químicos	15
1.4 Antimicrobianos naturales	16
1.4.1 Natamicina	17
1.4.2 Nisina	18
1.5 Películas y recubrimientos comestibles	21
1.5.1 Almidón como biomolécula principal de las películas y recubrimientos	25
1.5.2 Refuerzos en películas comestibles	26
Tratamientos de los rellenos: aplicación de ultrasonido	28
1.5.3 Antimicrobianos en películas comestibles: películas activas	29
1.6 Aplicaciones de las películas y recubrimientos comestibles	29
<i>Aplicación sobre un producto lácteo: Queso.</i>	29
1.7 Caracterización fisicoquímica de las películas	30
1.7.1 Propiedades mecánicas: Ensayo de tracción	30
1.7.2 Determinación del Color y la Transmitancia interna (Ti)	33
1.7.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	36
1.7.4 Permeabilidad al oxígeno (PO)	36
1.7.5 Solubilidad en agua (WS)	37
1.7.6 Análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	37
1.7.7 Propiedades térmicas	39
a) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
b) Análisis Termogravimétrico (TGA)	40
1.8 Caracterización microscópica de las películas	41
1.8.1 Microscopía óptica	41

1.8.2 <i>Microscopía electrónica</i>	42
1.9 Actividad antimicrobiana de películas y recubrimientos	42
1.9.1 <i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i>	42
1.9.2 <i>Estudio de la actividad de Barrera a la contaminación en alimentos</i>	43
1.9.3 <i>Estudio de la Difusión de los antimicrobianos en alimentos</i>	44
Objetivos	44
Objetivos generales.....	44
Objetivos específicos	44
CAPITULO 2	46
Elaboración y caracterización de recubrimientos	46
y películas comestibles antimicrobianos	46
y reforzados con salvado de arroz	46
1 Introducción	47
Objetivos	48
2 Materiales y Métodos	49
2.1 Materiales.....	49
2.2 Tratamiento del salvado de arroz.....	49
Aplicación de ultrasonido en salvado de arroz	49
2.3 Caracterización del salvado de arroz crudo y procesado. Contenido proximal	50
2.3.1 <i>Humedad.</i>	50
2.3.2 <i>Cenizas</i>	50
2.3.3 <i>Contenido de proteínas</i>	50
2.3.4 <i>Contenido de grasa</i>	51
2.3.5 <i>Fibra dietaria insoluble</i>	52
2.4 Distribución del tamaño de partícula del salvado de arroz procesado.....	52
2.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	53
2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	53
2.7 Preparación de los sistemas	53
a) Preparación de las películas con salvado de arroz.....	53
b) Preparación de los recubrimientos con salvado de arroz.....	55
2.8 Caracterización fisicoquímica de las películas comestibles	57
2.8.1 <i>Espesor</i>	57
2.8.2 <i>Propiedades mecánicas: ensayos de tracción</i>	57

2.8.3	<i>Color</i>	57
2.8.4	<i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA)</i>	57
2.8.5	<i>Solubilidad en agua</i>	58
2.8.6	<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	58
2.8.7	<i>Microestructura de las películas comestibles</i>	59
a)	Microscopía óptica	59
b)	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	59
2.9	Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos comestibles	59
2.9.1	<i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i>	60
2.9.2	<i>Barrera a la contaminación de cultivos mixtos</i>	61
2.9.3	<i>Difusión de los antimicrobianos en queso Port Salut</i>	62
2.9.4	<i>Actividad de barrera antimicrobiana de los recubrimientos sobre queso Port Salut</i>	62
2.10	Análisis estadístico	62
3	Resultados y discusión	63
3.1	Evaluación fisicoquímica del salvado de arroz.....	63
3.1.1	<i>Análisis proximal</i>	63
3.1.2	<i>Distribución de tamaño y morfología de las partículas de salvado de arroz procesado</i>	63
3.2	Caracterización fisicoquímica de películas.....	64
3.2.1	<i>Propiedades mecánicas: ensayo de tracción</i>	64
3.2.2	<i>Evaluación del color</i>	68
3.2.3	<i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA)</i>	69
3.2.4	<i>Solubilidad en agua (WS)</i>	71
3.2.5	<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	71
3.2.6	<i>Microestructura: microscopía óptica y SEM</i>	74
3.3	Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos	76
3.3.1	<i>Difusión en medio semisólido (Ensayo del halo)</i>	76
3.3.2	<i>Actividad de barrera de las películas</i>	77
a)	Barrera a la contaminación de un cultivo mixto en medio semisólido	77
b)	Barrera a la contaminación de cultivos mixtos en queso Port Salut	80
3.3.3	<i>Difusión de los antimicrobianos en queso Port Salut</i>	83
3.3.4	<i>Actividad de barrera antimicrobiana de los recubrimientos en queso Port Salut</i>	85

4 Conclusiones	88
CAPÍTULO 3	90
Elaboración y caracterización de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos y reforzados con expeller de soja	90
1 Introducción	91
Objetivos	91
2 Materiales y Métodos	92
2.1 Tratamiento del Expeller de soja	92
2.2 Caracterización del Expeller de soja sonicado. Contenido proximal	92
2.3 Tamaño de partícula del Expeller de soja sonicado.....	92
2.4 Preparación de las películas y recubrimientos con expeller de soja	92
2.5 Diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta	94
2.5.1 <i>Optimización</i>	94
2.6 Caracterización fisicoquímica de las películas comestibles	94
2.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	94
2.8 Propiedades térmicas	95
2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	95
2.10 Biodegradabilidad	95
2.11 Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos comestibles	96
2.11.1 <i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i> ...	96
2.11.2 <i>Actividad de barrera antimicrobiana de las películas y los recubrimientos sobre queso Port Salut</i>	96
2.12 Análisis estadístico	96
3 Resultados y Discusión	97
3.1 Distribución de tamaño de partículas.....	97
3.2 Análisis proximal del expeller de soja sonicado (SSE)	98
3.3 Caracterización fisicoquímica de películas.....	99
3.3.1 <i>Propiedades mecánicas: ensayos de tracción</i>	100
3.3.2 <i>Evaluación del Color</i>	101
3.3.3 <i>Solubilidad en agua (WS)</i>	101
3.4 Efecto del contenido de glicerol y expeller de soja sonicado sobre las propiedades físicas de las películas antimicrobianas	102

3.5	Niveles óptimos de SSE y Gly de la película comestible y caracterización adicional.....	106
3.6	Propiedades mecánicas: ensayos de tracción sistema óptimo y controles.....	107
3.7	Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	108
3.8	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	108
3.9	Análisis térmico	111
3.10	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	114
3.11	Biodegradabilidad	116
3.12	Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos	118
3.12.1	<i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i> .	118
3.12.2	<i>Actividad de barrera de las películas sobre queso Port Salut</i>	118
3.12.3	<i>Actividad de barrera de los recubrimientos sobre queso Port Salut</i>	120
4	Conclusiones.....	123
CAPÍTULO 4		124
Comparación entre técnicas de casteo y termo-compresión en el desarrollo de películas a base de almidón de mandioca conteniendo o no antimicrobianos naturales		124
1	Introducción	126
	Objetivos	126
2	Materiales y Métodos	127
2.1	Materiales.....	127
2.2	Preparación de la película	127
2.2.1	<i>Películas obtenidas por casteo</i>	127
2.2.2	<i>Películas obtenidas por termo-compresión</i>	128
2.3	Caracterización fisicoquímica de las películas formuladas	129
2.3.1	<i>Propiedades mecánicas: ensayo de tracción</i>	129
2.3.2	<i>Color y transmitancia interna (Ti)</i>	130
2.3.3	<i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO)</i>	130
2.3.4	<i>Solubilidad en agua y humedad</i>	131
2.3.5	<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	131
2.3.6	<i>Propiedades térmicas</i>	131
2.3.7	<i>Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)</i>	132
2.4	Actividad antimicrobiana de las películas	132
2.4.1	<i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i>	132

2.4.2 <i>Actividad de barrera antimicrobiana y difusión de la natamicina en películas sobre queso Port Salut</i>	132
2.5 <i>Análisis estadístico</i>	133
3. Resultados y discusión	134
3.1 <i>Caracterización fisicoquímica de películas</i>	134
3.1.1 <i>Propiedades mecánicas</i>	134
3.1.2 <i>Color y Transmitancia interna (T_i)</i>	137
3.1.3 <i>Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y permeabilidad al oxígeno (PO)</i>	141
3.1.4 <i>Solubilidad en agua (WS) y humedad</i>	142
3.1.5 <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	144
3.1.6 <i>Propiedades térmicas</i>	145
3.1.7 <i>Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)</i>	149
3.2 <i>Actividad antimicrobiana de las películas</i>	152
3.2.1 <i>Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)</i>	152
3.2.2 <i>Actividad de barrera antimicrobiana de películas sobre queso Port Salut</i>	153
3.2.3 <i>Difusión de la natamicina en películas sobre queso Port Salut</i>	156
4 Conclusiones	159
CONCLUSIONES GENERALES	160
REFERENCIAS	163

Glosario

A	Área de la sección transversal original de la muestra de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción
a*	Magnitud rojo/verde de la muestra en el sistema CIE Lab
ATR	Reflectancia total atenuada
b*	Magnitud amarillo/azul de la muestra en el sistema CIE Lab
B ₀	Valor de la respuesta ajustada en el punto central (0,0) de un diseño experimental
B ₁ y B ₂	Coefficientes de regresión lineal en el Modelo polinomial de un diseño experimental de dos variables
B ₁₁ y B ₂₂	Coefficientes de regresión cuadráticos en el Modelo polinomial de un diseño experimental de dos variables
B ₁₂	Coefficiente de regresión de productos cruzados Modelo polinomial de un diseño experimental de dos variables
C	Película control conteniendo almidón de mandioca y glicerol elaborada por casteo
CAA	Código Alimentario Argentino
C _{ab} *	Croma o pureza
CIE Lab	Sistema de medición del color de la Comisión Internacional de Iluminación
CNA	Película con almidón, glicerol y natamicina elaborada por casteo
CNANI	Película activa control conteniendo almidón de mandioca, glicerol, natamicina y nisina elaborada por casteo
CNI	Película con almidón, glicerol y nisina elaborada por casteo
Cry	Film comercial Cryovac®
D [3,2]	Diámetro de Sauter, diámetro medio ponderado en superficie en μm
D [4,3]	Diámetro de De Brouckere, diámetro medio ponderado en volumen en μm
d(0,5)	Representa el diámetro del 50% de la población acumulada de partículas con un diámetro menor a d(0,5)
d(0,9)	Representa el diámetro del 90% de la población acumulada de

	partículas con un diámetro menor a $d(0,9)$
DCC	Diseño Central Compuesto
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
Exp	Película conteniendo almidón, 1,4 g de glicerol y 0,46 g de expeller de soja sonicado
Exp2	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,2 g de expeller de soja sonicado
Exp3	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,3 g de expeller de soja sonicado
Exp4	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,4 g de expeller de soja sonicado
ExpNANI	Película conteniendo almidón, 1,4 g de glicerol, 0,46 g de expeller de soja sonicado, natamicina y nisina
F	Fuerza de tracción uniaxial media
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
G	Pendiente de la recta de cambio de peso en función del tiempo
Gly	Glicerol
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
e	Espesor del relleno
h	Espesor de la película
H.R.	Humedad Relativa
h_{ab}^*	Ángulo de tonalidad
L	Longitud de una muestra con forma de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción en la dirección de la fuerza de tracción uniaxial
L^*	Luminosidad de la muestra en el sistema CIE Lab
L_0	Longitud original de una muestra con forma de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción
L_0^* , a_0^* y b_0^*	Parámetros de color con sistema CIE Lab correspondientes a los sistemas control
MY	Módulo de Young o elástico

NA	Natamicina
NANI	Natamicina y nisina
NI	Nisina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTR	Tasa de Transmisión de Oxígeno
PBS	Succinato de polibutileno
PCA	Agar nutritivo, Plate count agar
PO	Permeabilidad al oxígeno
PRB	Salvado de arroz procesado
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
R	Espectro de reflexión
R_0	Espectro con fondo negro
R^2	Coefficiente de determinación
R_g	Espectro con fondo blanco
S1	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,1 g de salvado de arroz procesado
S1NANI _f	Película conteniendo almidón, glicerol, natamicina, nisina y 0,1 g de salvado de arroz procesado
S2	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,2 g de salvado de arroz procesado
S2NANI _{2c}	Recubrimiento conteniendo almidón, glicerol, 0,2 g de salvado de arroz procesado y el doble de concentración de natamicina y nisina
S2NANI _{3c}	Recubrimiento conteniendo almidón, glicerol, 0,2 g de salvado de arroz procesado y el triple de concentración de natamicina y nisina
S2NANI _c	Recubrimiento conteniendo almidón, glicerol, natamicina, nisina y 0,2 g de salvado de arroz procesado
S2NANI _f	Película conteniendo almidón, glicerol, natamicina, nisina y 0,2 g de salvado de arroz procesado
S3	Película conteniendo almidón, glicerol y 0,3 g de salvado de arroz procesado
S3NANI _f	Película conteniendo almidón, glicerol, natamicina, nisina y

	0,3 g de salvado de arroz procesado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SSE	Expeller de soja sonicado
Tcontrol	Película con almidón y glicerol elaborada por termo-compresión
T _g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis Termogravimétrico
T _i	Transmitancia interna
TNA	Película con almidón, glicerol y natamicina elaborada por termo-compresión
TNANI	Película con almidón, glicerol, natamicina y nisina elaborada por termo-compresión
TNI	Película con almidón, glicerol y nisina elaborada por termo-compresión
TSBYE	Caldo triptona de soja con extracto de levadura
TSYEc	Agar selectivo para el crecimiento de bacterias como <i>Listeria innocua</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
USFDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
WS	Solubilidad en agua
x ₁ y x ₂	Variables independientes en el Diseño Central Compuesto para 2 variables
YGC	Agar selectivo para el crecimiento de hongos y levaduras
YI	Índice de amarillo
ΔE	Diferencia de color
ΔL	Elongación total que sufre una muestra con forma de paralelepípedo sometida a ensayo de tracción
ΔP	Diferencia de presión de vapor de agua a través de la película
ε	Deformación originada por la fuerza de tracción uniaxial sobre una muestra con forma de paralelepípedo, sometida a ensayo de tracción, cociente entre el cambio de longitud de la muestra en la dirección de la fuerza y la longitud original

ε_r , SB	Deformación a la ruptura
σ	Esfuerzo en una muestra con forma de paralelepípedo, sometida a una fuerza de tracción uniaxial
σ_{fu}	Esfuerzo a la ruptura del relleno
σ_m	Resistencia en la ruptura de la matriz en un ensayo de tracción
σ_r , TS	Esfuerzo a la ruptura en MPa
τ_y	Resistencia interfacial en MPa
ψ	Variable dependiente genérica estimada a través de un modelo polinomial

CAPÍTULO 1

Introducción general: Tecnologías de preservación de alimentos, películas y recubrimientos comestibles compuestos

1.1 Tecnología de preservación de alimentos

Los alimentos son vitales para la supervivencia y el desarrollo de los seres humanos. Estos pueden consumirse crudos o procesados para obtener energía y mantener el crecimiento. Se conoce que, cada día se producen alimentos suficientes para todo el mundo, pero no siempre llegan a quienes los necesitan. Por esto, evitar su desperdicio se ha convertido en un reto clave en todos los sectores. Una de las soluciones sostenibles para contrarrestarlo resulta ser su conservación. La idea de conservación de alimentos se introdujo en la antigüedad, cuando nuestros antepasados buscaban formas de mantener los alimentos frescos y comestibles y les permitió a los humanos formar comunidades (Sridhar y col., 2020).

Las investigaciones en ciencia y tecnología de preservación de los alimentos, ya sea por parte de la Industria Alimentaria, Agencias Gubernamentales o Universidades, a menudo requieren la determinación de la composición y las características de los alimentos. La calidad de estos ha sido estudiada por diversos autores y se encuentra afectada por factores físicos, químicos y microbiológicos (Nielsen, 2017). La temperatura, humedad, presencia de oxígeno y luz, reacciones químicas, enzimas, microorganismos, insectos y el transcurso del tiempo son los principales motivos de alteraciones. La preservación de los alimentos depende fundamentalmente del control de estos factores y, en especial, el control del deterioro microbiológico. Es por esto que la industria alimentaria considera como principios: satisfacer a los consumidores, garantizar la seguridad microbiológica (salud de consumidores), extender la vida útil (reducción de la velocidad de reacciones químicas, enzimáticas, físicas y microbiológicas para minimizar cambios de calidad durante la distribución y almacenamiento), cumplir con las normativas vigentes, resolver problemas y desarrollar nuevos productos (ANMAT, 2022). De modo tal que todos los alimentos requieren del análisis de diversas características (composición química, contenido microbiano, propiedades físicas, propiedades sensoriales) tanto de las materias primas, su procesamiento y tratamiento, como del producto final que recibirá el consumidor.

Se ha comprobado que la aplicación de una tecnología de barrera o de factores combinados sobre el alimento (“hurdles”), interfiere con los mecanismos homeostáticos activos de las células vegetativas de hongos, levaduras y bacterias y los mecanismos homeostáticos pasivos de las esporas bacterianas (Li y col., 2016 y Sluka, 2016). El gasto de energía para mantener la homeostasis es fundamental para la vida de los microorganismos y, de este modo, su crecimiento resulta inhibido. En el caso donde la

demanda de energía para mantener la homeostasis supera la capacidad de producción de energía de la célula, ésta muere (Doyle y col., 2001). De esta manera, las tecnologías de preservación aplicadas pueden ser efectivas para destruir o inhibir microorganismos, pero pueden no ser adecuadas para preservar las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento. Por este motivo la combinación inteligente y estratégica de barreras permitirá mejorar la estabilidad y la seguridad microbiológica, la calidad sensorial y nutricional y los aspectos económicos de un alimento utilizando los recursos de forma más eficiente (Leistner y Gould, 2002; Singh y Shalini, 2016).

1.2 Tratamientos físicos térmicos y no térmicos

En general, los métodos físicos, son utilizados para inhibir, destruir o suprimir microorganismos indeseables (Barbosa-Canovas y col., 2000; Singh y Shalini, 2016). Estos métodos pueden categorizarse como Tratamientos físicos térmicos con la aplicación de calor (pasteurización, esterilización); y como Tratamientos físicos no térmicos (tratamientos alternativos) como ultrasonido, alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados o campos magnéticos oscilantes, ozono, entre otros.

El tratamiento físico térmico es una técnica que ha demostrado su eficacia en diversos sectores alimentarios desde productos de panadería y lácteos hasta frutas y verduras con el objetivo de eliminar los patógenos (Christiansen y col., 2020). El proceso generalmente implica un calentamiento de los alimentos a temperaturas de entre 75 y 90 °C o superior por un corto tiempo de 25-30 s. Sin embargo, al aplicarse dicha técnica, se han observado pérdidas de nutrientes, desperdicio de energía, disminución del valor nutricional y cambios organolépticos (Rosello'-Soto y col., 2018). Para minimizar o eliminar estos efectos adversos surgen los tratamientos alternativos no térmicos.

Asimismo, el crecimiento microbiano puede ser inhibido por almacenamiento en refrigeración o congelación o por procesos de deshidratación (secado, liofilización, crioconcentración).

1.3 Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos son útiles para la inhibición y el retardo del crecimiento de microorganismos y la inactivación de algunas células vegetativas. Pueden contribuir con el color, la textura, el sabor, el aroma, como así también con las propiedades

antioxidantes y antimicrobianas. Estos tratamientos se dividen en dos grandes grupos, métodos que modifican las propiedades sensoriales de los alimentos y métodos que no las modifican. Dentro del primer grupo se considera la adición de sales como salazón (deshidratación parcial de los alimentos por agregado de sal y adicionalmente refuerza el sabor e inhibe determinadas bacterias) o salmuera (inmersión de alimentos en una solución concentrada de sal), el ahumado (el humo utilizado tiene acción bactericida, antifúngica y cambios sobre el sabor y color del alimento), la acidificación por uso de ácidos orgánicos (encurtidos, escabeches, marinados y adobos) y la conservación por adición de azúcares (fermentaciones, dulces). Mientras que los tratamientos que no modifican las propiedades sensoriales consisten en la adición de productos y sustancias químicas artificiales o naturales como conservadores. Estas sustancias son capaces de inhibir y retardar el desarrollo y la proliferación de bacterias, levaduras y mohos o detener los procesos de fermentación, enmohecimiento u otras alteraciones biológicas de los alimentos y bebidas (Barón y col., 2005; Amit y col., 2017).

1.4 Antimicrobianos naturales

Los antimicrobianos son sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos (Código Alimentario Argentino, CAA, 2010). Pueden provenir de fuentes naturales o de la síntesis química. Los conservantes tradicionales más ampliamente usados son los propianatos, sorbatos y benzoatos. La selección y el uso de estos antimicrobianos está regulada por la legislación de cada país o región y para cada alimento en particular (Smid y Gorris, 2020).

En general, se busca que el antimicrobiano presente un amplio espectro de acción frente a microorganismos patógenos o alterantes del alimento al cual sea aplicado. Este deberá ser activo, causar el mínimo impacto organoléptico y no debe interferir con el proceso microbiológico que está previsto que ocurra, como en el caso de la maduración del queso (Lück y Jager, 1997; Batiha y col., 2021).

Actualmente existe una tendencia a optar por alimentos más naturales y frescos, fáciles de consumir, estables y seguros. Para poder cubrir estos requerimientos, está surgiendo un creciente interés en el estudio de nuevas tecnologías enfocadas a mejorar los procesos y la preservación de los alimentos. En este sentido ha aumentado la búsqueda por reemplazar los antimicrobianos químicos sintéticos por antimicrobianos naturales (Tiwari y col., 2009; Davidson y col., 2015).

En particular, los antimicrobianos naturales son biomoléculas orgánicas. El uso de estos aditivos alimentarios de origen natural implica el aislamiento, purificación, estabilización e incorporación de dichos compuestos a los alimentos con fines antimicrobianos (Naidu, 2000; Batiha y col., 2021). Estas sustancias pueden provenir de fuentes naturales de origen animal: proteínas, enzimas (lisozima, lipasas y proteasas) y polisacáridos (quitosano); de origen vegetal: compuestos fenólicos provenientes de hojas, flores, cortezas, tallos y ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas; de origen microbiano: bacteriocinas o bien de otras fuentes: ciertos procesos aplicados a alimentos pueden generar antimicrobianos como es el caso del ahumado y las reacciones de Maillard (Batiha y col., 2021; Smid y Gorris, 2020).

1.4.1 Natamicina

La natamicina (o pimarcina) forma parte de la familia de los polienos, con numerosas aplicaciones. Es de origen bacteriano, producida por *Streptomyces natalensis*, y se utiliza en la industria alimentaria, particularmente en quesos (Gallo y Jagus, 2006; Moatsou y col., 2015) como antimicrobiano natural para evitar la contaminación de los productos con levaduras y mohos (Te Welscher y col., 2010).

En la **figura 1.1** se observa la estructura molecular de la natamicina, la cual está caracterizada por la presencia de un largo anillo macrólido conteniendo cuatro dobles enlaces conjugados y un residuo de azúcar, tiene un peso molecular de 665,7 Da. Su fórmula molecular es $C_{33}H_{47}NO_{13}$ (Capitan Vallvey, 2000).

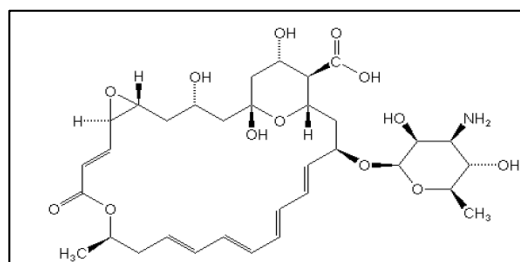


Figura 1.1- Estructura de la natamicina (Capitan Vallvey, 2000).

La natamicina es codificada como aditivo alimentario con la sigla E235 por la Unión Europea y ha sido aprobada en más de 40 países (Koontz y col., 2003; Costa y col., 2018). El Código Alimentario Argentino (CAA) establece que la natamicina puede ser

empleada para el tratamiento de cáscara de quesos de pasta dura o semidura o de sus cubiertas protectoras y de las envolturas de embutidos secos que deban sufrir un proceso de maduración. La concentración residual en la superficie de las cáscaras o envolturas no deberá ser mayor de 1 mg/dm² de superficie de queso o embutido, no debiendo detectarse la presencia del antimicótico en el interior del producto a una profundidad mayor de 2 mm. Aquella podrá además ser empleada en los alimentos que específicamente permita su uso como sustancia antimicótica la Autoridad Sanitaria Nacional (CAA, 2014). Se comercializa en polvo por distintas empresas como Santana, con el nombre de Veltranal® por Merck y como Delvovid® por la empresa DSM entre otras.

La natamicina actúa uniéndose a esteroides de membrana, principalmente ergosterol, pero sin permeabilizar la membrana plasmática. Inhibe la fusión vacuolar a través de una interacción específica con el ergosterol. Por esta razón es activa frente a los hongos y levaduras, pero no contra bacterias, virus o protozoos (Te Welscher y col., 2008, 2010). El Codex Alimentarius permite concentraciones máximas de natamicina (**Tabla 1.1**) diferentes al CAA.

Tabla 1.1 Aplicaciones de natamicina a distintos tipos de quesos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentarius (adaptación de Codex Stan, 2016)

Categoría de alimento	Dosis máxima en superficie (mg/dm²)	Año de vigencia
Queso no maduro	2	2006
Queso madurado	2	2006
Queso elaborado	2	2006
Productos análogos al queso	2	2006
Queso de proteínas del suero	2	2006

1.4.2 Nisina

La nisina forma parte de las bacteriocinas. Estas son proteínas o péptidos producidos por bacterias lácticas y que poseen actividad antimicrobiana, bactericida o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen (Smid

y Gorris, 2020). Las bacteriocinas han despertado un gran interés como alternativa para la preservación de alimentos en reemplazo de los antimicrobianos químicos sintéticos (Bathia y col., 2021).

La nisina es un polipéptido producido por cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, caracterizado por primera vez en 1947 por Mattick y Hirsch. Exhibe una actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias Gram positivas asociadas a los alimentos, y en particular frente a esporas resistentes a las altas temperaturas (Delves-Broughton y col., 1996; Moll y col., 1997). Varios investigadores han demostrado su actividad en productos lácteos, como quesos untables, ricota, leche y suero líquido frente a la contaminación de bacterias Gram positivas (Fernández y col., 2014; Ollé Resa y col., 2016; Berti y col., 2019).

Estudios toxicológicos han demostrado que dicha bacteriocina es no tóxica para el consumo humano y, por lo tanto, se ha permitido su utilización en más de 50 países como preservante de alimentos. Fue reconocida como preservante biológico seguro en 1969 por el Comité Experto de Aditivos de Alimentos de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización mundial de la Salud, FAO/OMS, (Thomas y col., 2000). En 1988 fue aprobada como aditivo de alimentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA) y aceptada como compuesto GRAS (Generalmente reconocido como seguro por sus siglas en inglés: Generally Recognize as Safe). Se comercializa en polvo por distintas empresas como Archine, Nutryplus, con el nombre de Nisin® por la empresa DSM, entre otras.

En general, se considera a la actividad antimicrobiana de la nisina como un proceso secuencial. En primera instancia, ocurre la difusión de la molécula por la pared de la célula. Luego se produce una interacción entre la nisina y la membrana citoplasmática, y posteriormente penetra dentro de la bicapa lipídica. Finalmente, se produce la formación del poro por desestabilización de la dinámica de la membrana y, consecuentemente, la inactivación microbiana (Breukink y col., 1997; Bathia y col., 2021).

La nisina es una molécula flexible, elongada y anfipática (Breukink y col., 1997, 1999; Brötz y col., 1998). Su masa molecular es de 3.353 Daltons en su forma monomérica, aunque es más estable como dímero de 7 kDa. La carga neta de la molécula será dependiente del pH y esto tiene influencia sobre la solubilidad de la nisina en un medio acuoso. A pH 2,2 la solubilidad es de 56 mg/mL; a pH 5, es de 3

mg/mL; y a pH 11, de 1 mg/mL (Rollega y col., 1995). Sin embargo, en los alimentos este comportamiento no resulta un inconveniente ya que los niveles de nisina utilizados son menores a 0,25 mg/mL.

La estructura de la nisina puede observarse en la **Figura 1.2** y fue determinada por Gross y Morell:

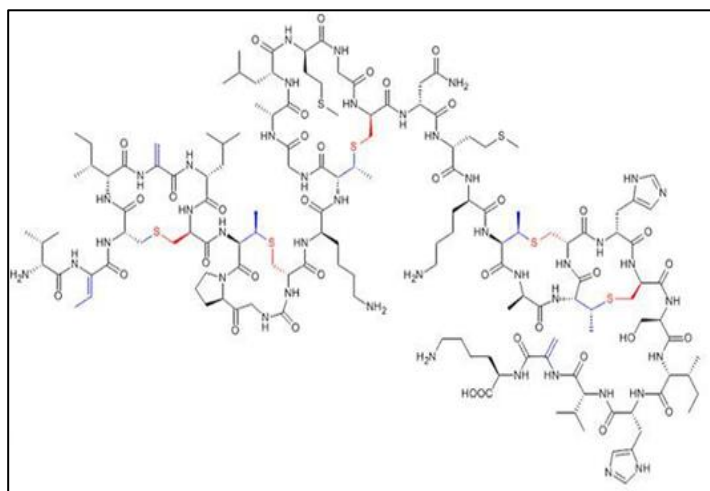


Figura 1.2- Estructura de la nisina (Estreptociencia, 2017).

Estudios de toxicidad han demostrado que el consumo humano de nisina es seguro a una dosis diaria aceptable de 2,9 mg/persona/día. En la industria alimentaria es utilizada en vegetales, bebidas, leche pasteurizada, postres lácteos, quesos, jamón enlatado, panceta, carne fresca, subproductos cárnicos y pescado fresco. En Argentina, el nivel máximo de nisina que se permite agregar en quesos procesados es de 500 UI/g (CAA, 2014), lo que equivale a 12,5 mg/kg, valores que coinciden con los permitidos por el Codex Alimentarius. En la **Tabla 1.2** se informan las concentraciones máximas permitidas de nisina y los alimentos que pueden ser tratados con este antimicrobiano según el Codex Alimentarius.

Tabla 1.2- Aplicación de nisina a distintos alimentos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentarius (adaptado de WHO y col., 2007).

Categoría de alimento	Dosis máxima (ppm)	Año de vigencia
Nata (crema) cuajada (natural/simple)	10	2009
Queso no maduro	12.5	2016
Queso madurado	12.5	2009
Productos análogos al queso	12.5	2010
Queso de proteínas del suero	12.5	2006
Postres lácteos	12.5	2016

1.5 Películas y recubrimientos comestibles

El envasado de los alimentos se realiza con el fin de preservar su calidad y extender su vida útil. Esta mejora solo es posible evitando ciertos factores como la contaminación química, el deterioro microbiano, el contacto con el oxígeno y controlando la pérdida o ganancia de humedad. Por este motivo, el material utilizado como envase debe poseer propiedades mecánicas, ópticas y térmicas adecuadas para evitar que se altere la calidad global del alimento. El plástico, o los materiales sintéticos derivados del petróleo, son el material de embalaje tradicional y más utilizado en la industria alimentaria. Si bien resultan económicos y presentan buenas propiedades mecánicas de película, no son biodegradables y contaminan el medioambiente (Jancy y col., 2020). Este hecho junto con la demanda de los consumidores que exigen productos más seguros, frescos, naturales y de mejor calidad que no impacten negativamente sobre su salud (De Corato, 2019), han impulsado que, junto a nuevas tecnologías de procesamiento, se desarrollen envases biodegradables, con nuevas propiedades (Fernández Valdés y col., 2015).

Los biopolímeros naturales (almidón, celulosa, pectina y quitosano) o polímeros sintéticos biodegradables como el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA), el succinato de polibutileno (PBS) y el alcohol polivinílico (PVA) o una combinación de estos, fueron propuestos para su uso generando envases biodegradables (Vartiainen y col., 2014; Nasrollahzadeh y col., 2021).

Las **películas comestibles** son matrices biopoliméricas preformadas que se aplican como envases sobre los alimentos con el fin de preservar su calidad. Mientras que los **recubrimientos comestibles** son una matriz delgada y continua que se constituye en la superficie del alimento. Estos recubrimientos se generan aplicando una solución de los componentes por inmersión, atomización, con pincel, por capa descendente o en lecho fluidizado, y posterior secado. En cuanto a las técnicas de elaboración de películas, pueden mencionarse dos principales, el casteo (en base húmeda) y la extrusión (con muy baja humedad). En la **figura 1.3a** puede observarse un ejemplo del proceso de obtención de películas por casteo. La suspensión o slurry (agua, etanol, ácido acético o conteniendo varios biopolímeros) se dispensa como una capa delgada sobre un molde y una vez eliminado el solvente se constituye la película por formación de una estructura continua o red filmógena debido a la interacción entre las macromoléculas. Las condiciones de secado influyen en el espesor final y las características estructurales de la película resultante y, por lo tanto, deben controlarse. En la **figura 1.3.b** puede observarse un ejemplo del proceso de obtención de películas por extrusión y posterior termo-compresión. En esta técnica se realiza un moldeo por compresión a partir de un pellet generado en un extrusor sin agregado de solvente con aplicación de altas temperaturas y presión. En la **figura 1.3.c** puede observarse un ejemplo del proceso de obtención de recubrimientos por inmersión. En este proceso los alimentos a recubrir son inmersos en la suspensión o slurry durante un cierto tiempo controlado. Luego se retiran y se colocan en bandejas dentro de una cámara con convección y temperatura controlada donde se elimina el solvente hasta la constitución del recubrimiento como una capa muy delgada sobre la superficie del alimento tratado.

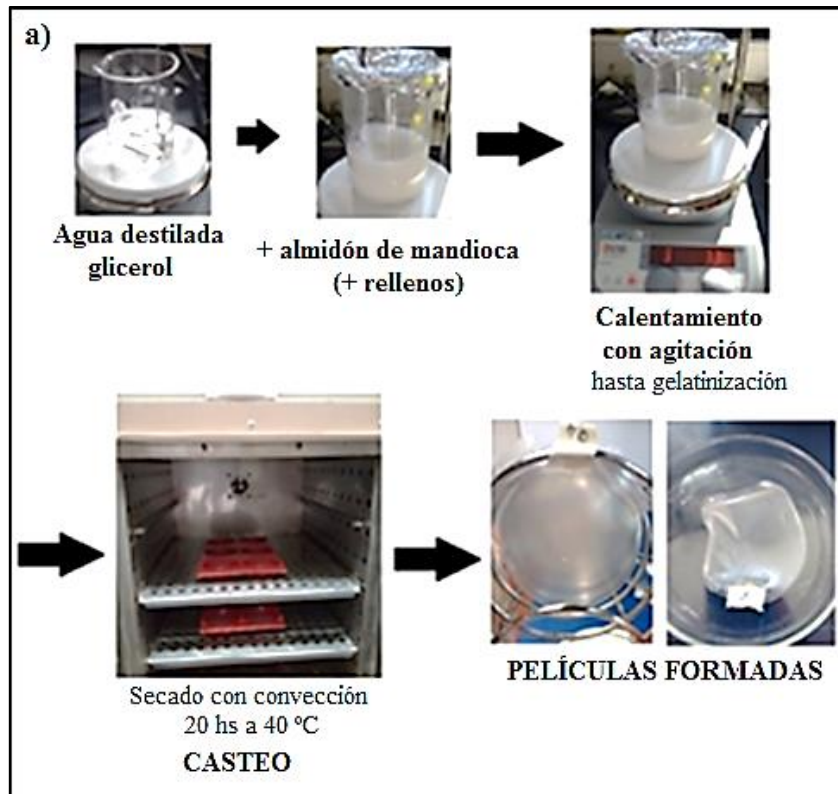


Figura 1.3- a) Ejemplo de elaboración de películas por casteo.

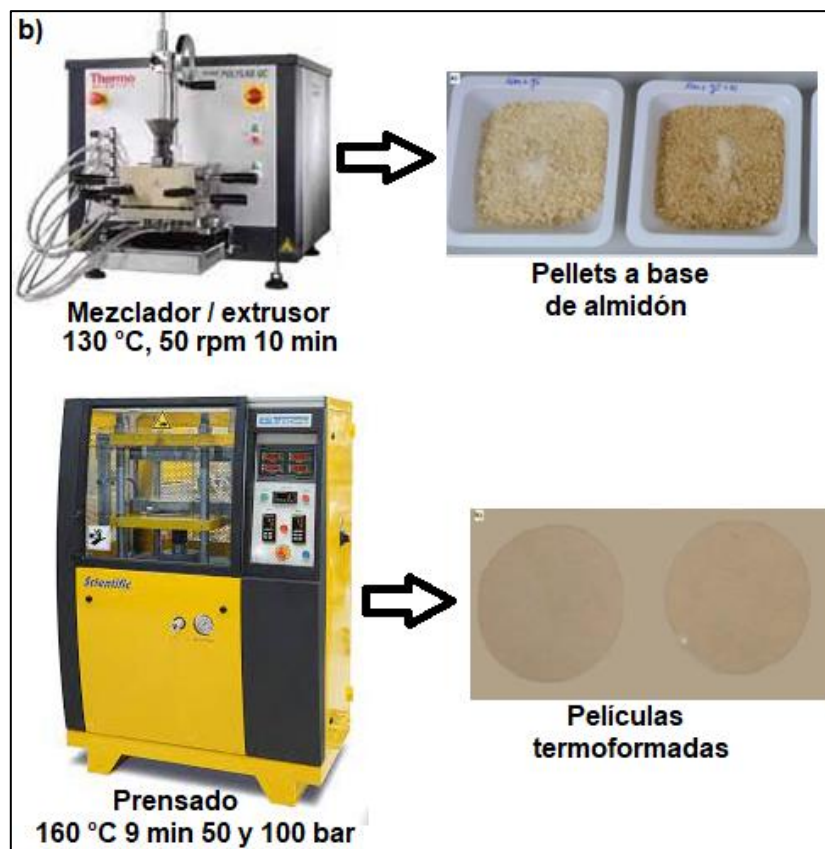


Figura 1.3- b) Ejemplo de elaboración de películas por termo-compresión.

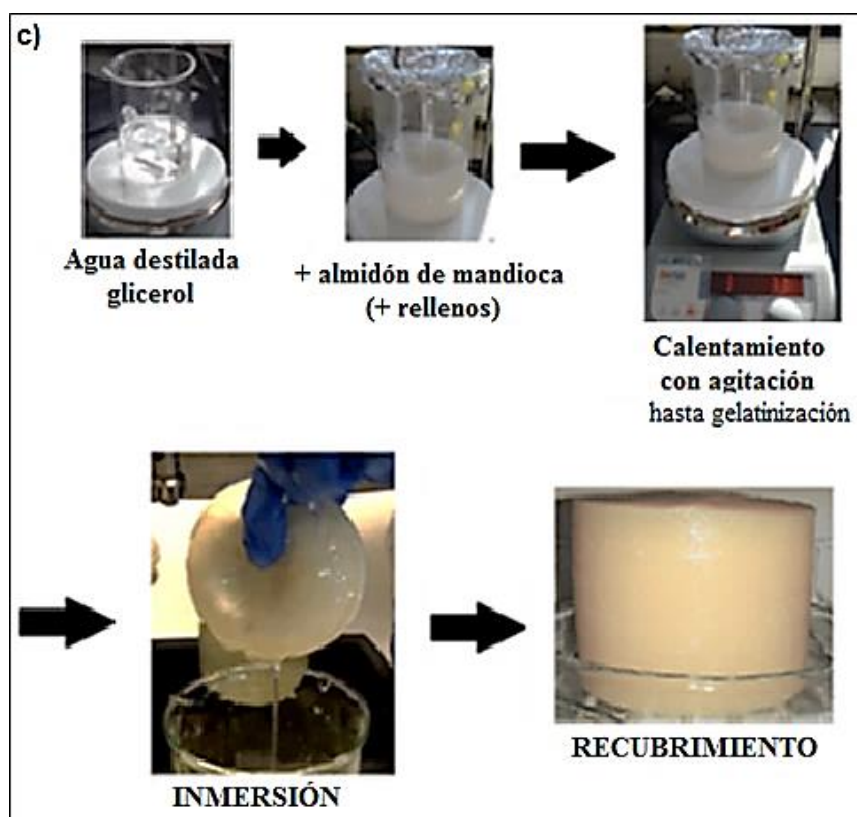


Figura 1.3- c) Ejemplo de elaboración de recubrimientos por inmersión.

Tanto las películas como los recubrimientos comestibles presentan las ventajas de poder ser ingeridas con el alimento, de regular el intercambio de gases y de mejorar las características nutricionales y organolépticas del alimento. A su vez, las películas comestibles permitirían reducir la cantidad de materiales no degradables, por ejemplo, mediante el uso de envases plásticos de menor espesor, disminuyendo la contaminación generada por estos. Adicionalmente, pueden incorporar en su formulación aditivos alimentarios como conservantes, permitiendo modular el contenido de los mismos en la interfase o en la superficie, convirtiéndose en envases activos (Durango y col, 2011; Kechichian y col., 2010; Rojas-Graü y col., 2009).

Generalmente, estas matrices se forman a partir de tres grupos de componentes básicos: biomoléculas de alto peso molecular, un plastificante de bajo peso molecular y un solvente. El uso de biopolímeros comestibles, naturales y de fuentes renovables provenientes de plantas y animales en aplicaciones de envasado de alimentos, como se mencionó anteriormente, han surgido como una alternativa por sus propiedades filmogénicas y comportamiento amigable con el medioambiente (Daybelis y col., 2015; Gilfillan y col., 2012).

1.5.1 Almidón como biomolécula principal de las películas y recubrimientos

El almidón resulta ser uno de los biopolímeros más utilizado para obtener películas y recubrimientos debido a su alta disponibilidad a través de una fuente renovable y su gran capacidad para formar una matriz polimérica inodora, incolora y transparente (Vásconez y col., 2009) con una baja permeabilidad al oxígeno, que resulta de gran interés para la preservación de alimentos (Jiménez y col., 2012). Adicionalmente, es especialmente atractivo por su biodegradabilidad y bajo costo (Pagella y col., 2002; Lafargue y col., 2007).

Según la FAO (Aristizábal y col., 2007), en su Guía de técnica para producción y análisis de almidón de tapioca, mandioca o yuca (*Manihot esculenta*), este almidón se destaca por las siguientes propiedades: la alta transparencia y la conveniencia para alimentos cocinados listos y salsas; la alta resistencia a la acidez y la buena aplicabilidad para salsas ácido-básicas y mermeladas; la alta viscosidad especialmente importante para postres, pudines, sopas, rellenos, gomas; la alta pureza y la ausencia de gluten, fosfatos, aceites, grasas y proteínas, ideal para alimentos de dietas bajas en grasa, alimentos sin gluten y alimentos antialérgicos. Adicionalmente, posee una baja temperatura de gelatinización (entre 62 y 73 °C).

La estructura de los gránulos de almidón puede observarse en la **figura 1.4**.

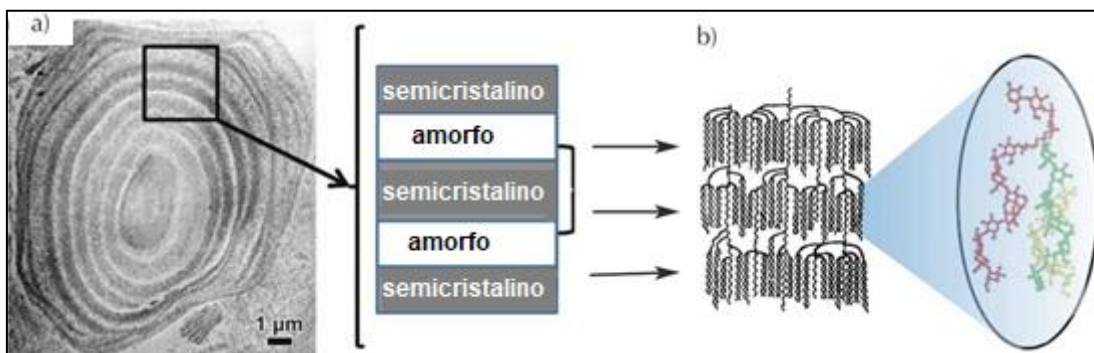


Figura 1.4 – Estructura de gránulo de almidón (adaptada de Serge Pérez, ESRF).

La estructura interna del gránulo de almidón está constituida por anillos concéntricos alternados semicristalinos y amorfos. En la **figura 1.4.a)** se muestra un gránulo de almidón con regiones alternantes semicristalinas y amorfas (colores oscuros y claros, respectivamente). En la **figura 1.4.b)** se observa que las zonas amorfas presentan la mayor cantidad de ramificaciones (zona menos organizada) y las zonas cristalinas presentan

las moléculas más linealizadas (sin ramificaciones, más organizadas). Es decir, existen dos tipos de estructuras, una es una doble hélice correspondiente a un polímero de amilopectina y la otra es helicoidal, correspondiente a un polímero de amilosa donde sus cadenas glucosídicas se disponen en forma de hélice con 6 unidades de glucosa por vuelta (Maaran y col., 2014). En particular, los gránulos de almidón de mandioca poseen forma de esferas truncadas (**Figura 1.5**) de superficie lisa, de tamaño homogéneo que varía entre 2 y 18 μm (Loksuwan y col., 2007; Rahaman y col., 2021).

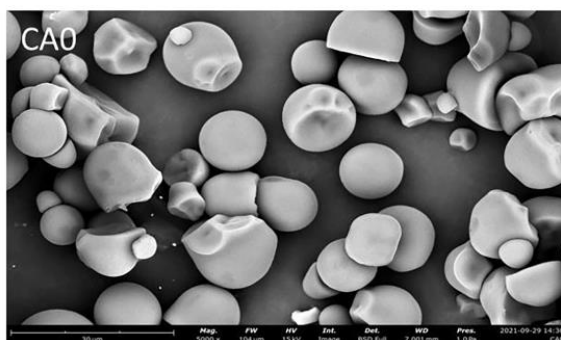


Figura 1.5- Microestructura de gránulos almidón de mandioca por microscopio electrónico de barrido (Rahaman y col., 2021)

Los plastificantes, como el glicerol, son generalmente incorporados para mejorar el procesamiento y promueven la fusión/movilidad del polímero para que sea dúctil a temperatura ambiente (Avérous y Halley, 2009). Estos compuestos disminuyen la atracción intermolecular entre las cadenas aumentando la flexibilidad de la matriz, la resistencia a la fractura y la constante dieléctrica, reducen la tensión de deformación, la dureza, la densidad, la viscosidad y la carga electrostática de los polímeros (García y col., 2000, Rosen, 1982).

1.5.2 Refuerzos en películas comestibles

Se ha comprobado que las coberturas de almidón presentan algunas desventajas como propiedades mecánicas inestables debido al fenómeno de retrogradación y una permeabilidad al vapor de agua relativamente elevada (Wan y col., 2015, Bagheri y col., 2019). Abordar estos inconvenientes es un factor clave en el estudio de estos materiales y el desarrollo de nuevos envases biodegradables como las películas y recubrimientos. A su vez, el almidón es higroscópico debido a los grupos hidroxilo presentes. No obstante, esta característica se puede contrarrestar con la adición de un relleno natural

como microfibras o nanofibras, que podrían disminuir la interacción con el agua y, al mismo tiempo, aumentar el esfuerzo a la ruptura y el módulo elástico (Cerqueira y col., 2009). La incorporación de rellenos no solo mejora potencialmente las características físico-mecánicas de las películas, sino que también puede agregarles propiedades antimicrobianas y nutricionales (Bagheri y col., 2019).

El relleno puede ser de naturaleza orgánica como las fibras vegetales, la celulosa microcristalina, la celulosa nanocristalina (NCC) o los nanocristales de celulosa (CNC), las nanofibrillas de celulosa (CNF) o bien, de naturaleza inorgánica como la montmorillonita (MMT) y el carbonato de calcio (Abdul y col., 2019).

Un material compuesto, como las matrices poliméricas con refuerzos, puede definirse como un material multi-fase formado por materiales con distintas propiedades fisicoquímica. De manera tal que estos materiales combinados produzcan mejoras sobre las propiedades del sistema (Šupová y col., 2011; Tajarudin y col., 2022). Es decir, están compuestos por dos fases: una fase matriz y otra fase material de relleno. El análisis y conocimiento de la composición del relleno, su tamaño y sus grupos funcionales característicos (zonas de interacción posibles), dan a conocer las distintas mejoras que podrían proporcionar con su incorporación al sistema según las interacciones que se producirían en la interfaz (Bashir y col., 2021; Abdul y col., 2019; Kargarzadeh y col., 2017).

En el caso de matrices poliméricas reforzadas los objetivos principales son mejorar las propiedades mecánicas y de solubilidad. En este sentido, Tajarudin y col. (2022) reportaron que la incorporación de micro y nanocelulosa mejoró notablemente las propiedades mecánicas y de barrera al agua de distintas matrices.

En estudios recientes, a fin de mejorar las propiedades de barrera, estructurales y mecánicas de las películas de almidón, diferentes autores formularon matrices amiláceas con la incorporación de proteína como la zeína (Pérez y col., 2021), de nanoencapsulado de extracto de flor de Jamaica (Toro-Márquez y col., 2018) o con fibras naturales provenientes de vegetales. En este sentido, Chen y col. (2009) reportaron que la transparencia, el esfuerzo a la ruptura y la deformación a la ruptura de las películas fueron mejoradas cuando se incorporaron nanopartículas de fibra de cáscara de guisantes en películas de almidón de guisante en comparación con las películas sin relleno. Otros autores también formularon películas compuestas, incorporando fibras naturales como la piel de maracuyá (Moro y col., 2017), kenaf (Zainuddin y col., 2013), luffa (Kaewtatip y Thongmee, 2012) y jute (Prachayawarakorn y col., 2013). De manera

similar, Ollé Resa y col. (2021) analizaron películas comestibles de almidón de mandioca reforzadas con salvado de calabaza y relleno de avena. Dichos biocomponentes desarrollaron fuertes enlaces entre la fibra y la matriz mejorando las propiedades mecánicas. De esta manera se pudo demostrar que cuando las fibras tienen una buena dispersión en la matriz, evitando aglomeraciones, se logra una resistencia óptima (Gilfillan y col.; 2012).

Tratamientos de los rellenos: aplicación de ultrasonido

Es de destacar que la aplicación de técnicas, como la molienda y tamizado y especialmente, el tratamiento con ultrasonido sobre los rellenos, contribuye a la reducción del tamaño de partículas. Esta disminución da lugar a mayores áreas de contacto lo cual puede facilitar la dispersión en la matriz y la exposición de grupos funcionales. De esta manera es posible mejorar las propiedades de las películas cuando forman parte de ellas al promover mayores y mejores interacciones y constituir red tridimensional integrada (Niendorf y col., 2021; Bashir y col., 2021). Por ejemplo, al reducir el tamaño del relleno de fibra de cáscara de arroz de micro a nano escala fue posible mejorar significativamente la resistencia de la matriz (Kargarzadeh y col., 2017)

En el caso del ultrasonido, se han propuesto dos mecanismos que explican la alteración de las estructuras por cavitación (Kumar y col., 2023). Por un lado, la aplicación de campos acústicos en un medio líquido, como el agua, los cuales provocan la formación de ondas interfaciales e inducen la ruptura de partículas. Por el otro, la generación de ondas ultrasónicas que inducen la formación de microburbujas, y su posterior colapso debido a las variaciones de presión. El colapso de cada burbuja crea una implosión macroscópica y turbulencia localizada dando como resultado la erosión y fractura de las partículas, reduciendo su tamaño. Yan y col. (2021) demostraron que la incorporación de nanopartículas de almidón obtenidas por ultrasonido en matrices a base de quitosano aumentó significativamente sus propiedades mecánicas. Estos autores atribuyeron la mejora a la elevada cristalinidad de las nanopartículas, a su tamaño (al aumentar la superficie interfacial de contacto entre el relleno y la matriz) y a la mayor cantidad de interacciones puente de hidrógeno.

1.5.3 Antimicrobianos en películas comestibles: películas activas

Asimismo, una relevante funcionalidad de los envases activos es su capacidad de soportar y modular el contenido de aditivos (antioxidantes, antimicrobianos, entre otros). Permiten localizarlos en la interfase de interés y que estos se liberen lentamente, incrementando su acción por un tiempo prolongado y manteniendo una elevada concentración en la superficie (Ribeiro y col., 2021). A su vez, contribuyen a su protección al reducir la interacción con la matriz alimentaria (Civelek y Cagri-Mehmetoglu, 2019; González-Forte y col., 2018; Moatsou y col., 2015). En este sentido, Ge y col. (2017) demostraron una actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* debido a la adición de nisina en películas biodegradables comestibles a base de gelatina reforzadas con montmorillonita amino-funcionalizada. Igualmente, Costa y col. (2018) mencionaron que la incorporación de antimicrobianos como la natamicina en recubrimientos a base de almidón resultó en una reducción del deterioro producido por hongos y levaduras en diferentes tipos de queso (Kashar, Gorgonzola, Port Salut, Muzzarella).

1.6 Aplicaciones de las películas y recubrimientos comestibles

Aplicación sobre un producto lácteo: Queso.

El queso, un alimento muy antiguo, presenta diversos puntos críticos a lo largo de su elaboración, siendo la etapa de almacenamiento uno de los más importantes. Durante esta etapa ocurre frecuentemente el desarrollo de microorganismos perjudiciales que colonizan la superficie. Estos pueden causar deterioro, mal sabor, aromas u otros productos metabólicos indeseables que reducen la calidad del queso y pueden representar un peligro para la salud pública (Moatsou y col., 2015). Actualmente en Argentina, se permite una inmersión en una solución de antifúngico conteniendo sorbato de potasio o natamicina previo a la maduración y almacenamiento de acuerdo a lo establecido por el CAA. Sin embargo, el problema no está completamente resuelto y uno de los grandes desafíos que se presenta es la eliminación de dicha contaminación para mantener este tipo de producto seguro por más tiempo. Actualmente, diversos autores han estudiado la aplicación de matrices (películas y recubrimientos) en quesos mejorando sus características durante la maduración y el almacenamiento. En un estudio previo (Berti y col., 2019) se ha demostrado que es posible una mejor preservación de queso Gouda durante la maduración por aplicación de un recubrimiento a base de almidón conteniendo natamicina y nisina, evitando a su vez una contaminación post-

proceso. Estos resultados son promisorios y dan lugar a pensar futuros desarrollos con diversas matrices comestibles.

1.7 Caracterización fisicoquímica de las películas

Las propiedades fisicoquímicas de las películas estarán dadas por los materiales que las componen, su conformación estructural y las interacciones entre los componentes.

1.7.1 Propiedades mecánicas: Ensayo de tracción

Las propiedades mecánicas describen la respuesta de un material a fuerzas o deformaciones aplicadas.

El comportamiento mecánico incide en la durabilidad de las películas y en su habilidad para proteger y/o mejorar la integridad de los alimentos en los que se aplica. Es habitual que las evaluaciones de este comportamiento se realicen a través de ensayos de tracción y/o de punción. Los parámetros evaluados para su caracterización son la fuerza o esfuerzo y el porcentaje de deformación a la ruptura, el cual representa la habilidad de las películas para estirarse (Chillo y col., 2008; Lim y col., 2010).

El esfuerzo a la ruptura es una medida de la resistencia de las películas y la deformación a la ruptura es una medida de su capacidad de estiramiento antes de romperse. Ambas propiedades son muy importantes y deben ser caracterizadas en un material de envasado (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Lim y col., 2010). Es deseable que las películas comestibles posean suficiente resistencia mecánica y extensibilidad, a fin de mantener la integridad frente a tensiones externas que pueden ocurrir durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Yang y Paulson, 2000).

Para realizar el ensayo, se considera una muestra con forma de paralelepípedo rectangular de longitud L_0 y de sección transversal de área A sometida a una fuerza de tracción uniaxial F como se muestra en la **Figura 1.6**.

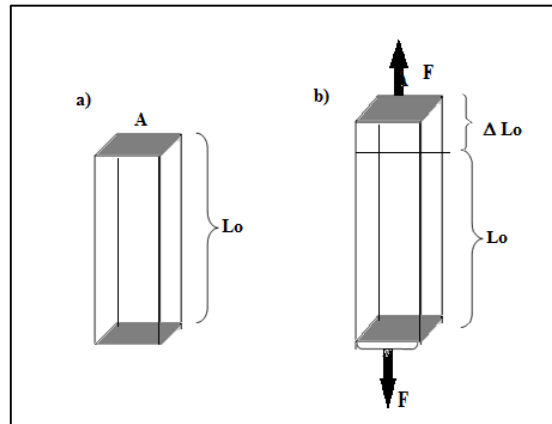


Figura 1.6- Ensayo de tracción. a) Muestra con forma de paralelepípedo previo a la aplicación de la fuerza. b) Muestra sometida a una fuerza de tracción uniaxial F que produce la extensión de la muestra.

Por definición, el esfuerzo (σ) en la muestra de paralelepípedo es igual al cociente entre la fuerza de tracción uniaxial media (F) y la sección transversal original (A) de la muestra (**ecuación 1.1**).

$$\sigma = \frac{F}{A} \left[\frac{N}{m^2} \right] = \frac{F}{A} [Pa] \quad (1.1)$$

Cuando se aplica a una muestra este tipo de fuerza, se produce una elongación de esta en la dirección de la fuerza. Se define la deformación (ε) originada por la acción de F , como el cociente entre el cambio de longitud de la muestra en la dirección de la fuerza y la longitud original (**ecuación 1.2**).

$$\varepsilon = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{\Delta L}{L_0} \left[\frac{m}{m} \right] \quad (1.2)$$

Si el material vuelve a sus dimensiones originales cuando la fuerza cesa se dice que el material ha sufrido una deformación elástica. Si el material es deformado hasta el punto en el cual las moléculas constitutivas no pueden recuperar sus posiciones originales, se dice que ha experimentado una deformación plástica.

Durante el ensayo de tracción, la deformación se concentra en la región central de la probeta la cual, en una primera aproximación, se supone que posee una sección transversal uniforme a lo largo de su longitud.

Adicionalmente se define el Módulo de Young o elástico (MY) como la pendiente inicial de la curva esfuerzo-deformación. El MY depende de la temperatura, de la velocidad de deformación (Mano y Viana, 2001) y es característico del material.

Los ensayos de tracción se realizan, en general, en máquinas universales de testeo. La muestra se sostiene por sus extremos en la máquina por medio de mordazas. Las mordazas someten la muestra a una elongación creciente con una velocidad constante. La medición de la carga aplicada instantáneamente (F) y el cálculo de la elongación (ΔL) permiten evaluar el comportamiento del material.

Convirtiendo los datos de la fuerza en datos de esfuerzo y los de elongación, en deformación, es posible la construcción de una gráfica esfuerzo-deformación como la representada en la **Figura 1.7**.

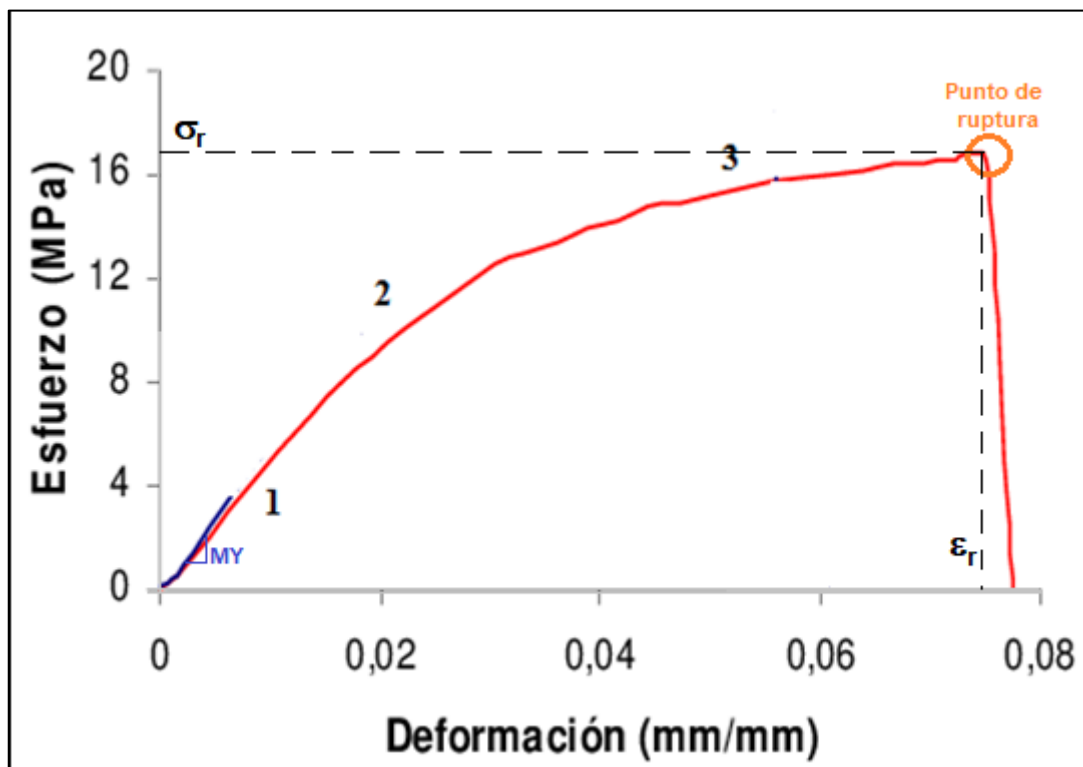


Figura 1.7- Modelo de curva esfuerzo-deformación

En dicha curva se observan distintas regiones que se describen a continuación:

1. Zona de deformaciones elásticas: en esta zona, las deformaciones se reparten a lo largo de la muestra, son de pequeña magnitud y, si se retirara la carga aplicada, se recuperaría la forma inicial.

2. Zona de deformaciones plásticas: en dicha zona, si se retirara la carga aplicada, la muestra recuperaría sólo parcialmente su forma quedando deformada permanentemente. Las deformaciones en esta región son mayores que en la zona elástica.

3. Zona de estricción: en dicha zona, las deformaciones se concentran en la parte central de la muestra apreciándose una marcada reducción de la sección de la misma, momento a partir del cual las deformaciones continuarán acumulándose hasta la ruptura. La ruptura es la responsable del descenso de la curva esfuerzo-deformación.

A partir de este ensayo, es posible obtener los parámetros esfuerzo a la ruptura (σ_r , τ_s), deformación a la ruptura (ϵ_r , SB) y el Módulo de Young (MY) característicos del material.

En particular, los geles de almidón pueden ser considerados como un material compuesto donde los gránulos hinchados (amilopectina) están en una matriz continua de moléculas de amilosa entrelazadas, reforzándola. Las propiedades mecánicas de los sistemas de almidón (películas comestibles) se ven influenciadas por las características reológicas de la matriz de gel de amilosa, la fracción de volumen entre amilosa y amilopectina y la rigidez de la matriz, así como por las interacciones que se generan.

Adicionalmente, para materiales compuestos, como las películas con los rellenos, puede obtenerse según Shia y Hui (1998) una relación de aspecto crítica, $\left(\frac{l}{e}\right)_c = \frac{\sigma_{fu}}{2\tau_y}$ que relaciona la longitud (l) y espesor (e) del relleno con la resistencia interfacial (τ_y , MPa) y el esfuerzo a la ruptura del relleno (σ_{fu} , MPa). Dicho parámetro, corresponde al valor máximo para el cual se puede alcanzar el esfuerzo máximo permisible para una carga dada. Este parámetro está determinado por las propiedades del compuesto (relleno y matriz) y las interacciones en la interfaz fibra-matriz. A partir de los datos de la literatura, se obtiene σ_{fu} (Chen, Xu y Shivkumar, 2018) de acuerdo con el relleno utilizado mientras que τ_y se estima como $\sigma_m/2$ (σ_m , resistencia en la ruptura de la matriz en un ensayo de tracción).

1.7.2 Determinación del Color y la Transmitancia interna (Ti)

La determinación del color resulta de gran importancia puesto que esta propiedad posee una influencia directa sobre la aceptabilidad del consumidor (Hunter y col., 2000), sobre todo cuando las películas son destinadas al envasado de alimentos (Kunte y col., 1997).

Para la determinación del color, uno de los sistemas más utilizados es el sistema CIE Lab (ASTM 1925): El mismo se encuentra representado en la **Figura 1.8**. El valor L^* mide la luminosidad de la muestra, representando la aproximación matemática de la respuesta del ojo al negro-blanco. Toma valores entre 100 y cero, siendo el 100 corresponde al blanco y el cero al negro. El valor a^* mide la magnitud de rojo/verde (los valores positivos muestran prevalencia del rojo, los negativos del verde), y el valor b^* mide la magnitud de amarillo/azul (los valores positivos marcan prevalencia del amarillo y los negativos del azul). La información de todos ellos permite identificar y definir todos los matices.

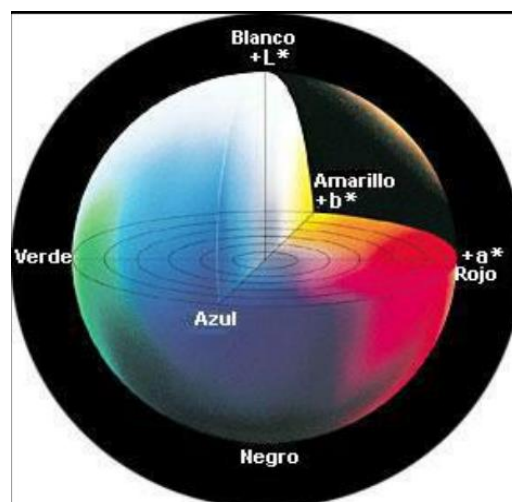


Figura 1.8- Parámetros de color del sistema CieLab

Para determinar los atributos de color, es también necesario definir el tipo de iluminante (D65 o C) y la posición del observador (2° o 10°) utilizados durante las mediciones.

Las funciones de color son valores que se obtienen por combinación matemática de los valores triestímulo (XYZ) que representan los atributos de color. De acuerdo con la norma Test Method for Yellowness Index of Plastics, se define el Índice de Amarillo (Yellowness index, YI) mediante la **ecuación 1.3**:

$$YI = \frac{100}{Y} (1,2769X - 1,0592Z) \quad (1.3)$$

donde X, Y y Z corresponden a los valores triestímulo del espécimen bajo condiciones de iluminante C y observador de 2°. Un valor positivo de YI describe la presencia y la 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.

Asimismo, puede obtenerse la transparencia a través de la transmitancia interna (T_i), aplicando la teoría de Kubelka-Munk de la dispersión múltiple del espectro de reflexión utilizando los espectros de reflexión. Se deben considerar las coordenadas de color del CIELab (iluminante D65 y observador 10°) obtenidas a partir de la reflectancia de una capa de espesor infinito del material según Hutchings (1999). Por lo tanto, las coordenadas T_i , a^* y b^* se determinan según

$$T_i = \sqrt{(a^* + R_o)^2 - b^2} \quad (1.4)$$

$$a^* = \frac{1}{2} \left[R + \left(\frac{R_o - R + R_g}{R_o * R_g} \right) \right] \quad (1.5)$$

$$b^* = \sqrt{a^{*2} - 1} \quad (1.6)$$

Donde R: espectro de reflexión, R_o : espectro con fondo negro y R_g : espectro con fondo blanco. También pueden evaluarse las propiedades colorimétricas y de transparencia de las películas en términos de ángulo de tonalidad (h_{ab}^*):

$$h_{ab}^* = \text{artg} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (1.7)$$

Y en términos de croma o pureza (C_{ab}^*):

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1.8)$$

La diferencia de color (ΔE) entre las películas evaluadas frente a películas consideradas controles, se calcula a través de la **ecuación 1.9**:

$$\Delta E = (\Delta L^* + \Delta a^* + \Delta b^*)^{1/2} \quad (1.9)$$

$$\Delta L^* = L^* - L_o^* ; \Delta a^* = a^* - a_o^* ; \Delta b^* = b^* - b_o^*$$

Donde L_o^* , a_o^* y b_o^* son los parámetros correspondientes a los sistemas control y L^* , a^* y b^* son los parámetros correspondientes a los diferentes sistemas evaluados.

1.7.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad en películas puede definirse como la transmisión de un permeato a través de un material resistente (Donhowe y Fennema, 1994). Los resultados de permeabilidad al vapor de agua pueden ser útiles para comprender los posibles mecanismos de transferencia de masa (flujo de vapor de agua) y las interacciones de soluto y polímero en películas comestibles. De acuerdo con la termodinámica del proceso irreversible, la diferencia de potencial químico del agua es la fuerza impulsora de la transferencia de agua a través de una película. Cuando el proceso ocurre a temperatura y presión constantes, la diferencia de potencial químico del agua resulta proporcional a la diferencia de concentración de vapor de agua entre las dos caras (Morillon y col., 2000).

La permeabilidad al vapor de agua de las películas puede determinarse gravimétricamente. Los cambios de peso se registran mediante una balanza granataria. La ganancia de peso de las celdas se grafica en función del tiempo, obteniéndose una dependencia lineal y, mediante regresión, se calcula la pendiente de la recta. Finalmente, la PVA se calcula de acuerdo con lo propuesto por Gennadios y col. (1994), **ecuación 1.10:**

$$PVA = \frac{G * h}{A * \Delta P} \quad (1.10)$$

Donde G es la pendiente de la recta de cambio de peso en función del tiempo, h es el espesor de la película, A es el área expuesta de la película y ΔP es la diferencia de presión de vapor de agua a través de la película.

1.7.4 Permeabilidad al oxígeno (PO)

La permeabilidad al oxígeno es un parámetro de los envases y, en particular, de las películas, que expresa la capacidad de estas para permitir o no la difusión del oxígeno desde el exterior del envase hacia el interior atravesando material de empaque. La PO depende del tipo de material, mientras que la velocidad de permeación depende

del espesor y del contenido de humedad. Las muestras de películas se colocan con su duplicado en un equipo donde circula un flujo de oxígeno bajo una atmósfera de nitrógeno. En un compartimento de una celda de permeación. En el otro compartimento, se hace circula N_2 solamente. Ambos compartimentos están separados por la película en estudio. Se fijan los parámetros de flujo y se coloca el valor del espesor promedio de cada película. Se determina la Tasa de Transmisión de Oxígeno (OTR) y se realizan los cálculos para obtener la permeabilidad. La PO se calcula multiplicando la OTR por el espesor promedio de la película (h) y dividiéndola por la diferencia de presión parcial de oxígeno a un lado y otro de la película (ΔP) (**ecuación 1.11**). El espesor de la película se mide con un micrómetro electrónico digital.

$$PO = \frac{OTR * h}{\Delta P} \quad (1.11)$$

1.7.5 Solubilidad en agua (WS)

La solubilidad en las películas se define como el porcentaje de materia seca solubilizada después de 24 horas de inmersión en agua destilada (Gontard y col., 1992). La determinación de este parámetro es de gran importancia para establecer la posible aplicación de la matriz en alimentos. Si la solubilidad es baja, puede ser utilizada para la protección de alimentos con actividad de agua elevada. Mientras que, si la solubilidad es alta, pueden utilizarse para contener porciones de ingredientes o en alimentos listos para consumir. En ambos casos, para que sea posible su consumo junto con el alimento, todos los componentes de las películas deben estar permitidos en la legislación local (CAA) y no alterar negativamente sus características organolépticas. La solubilidad se calculó mediante la siguiente ecuación 1.12:

$$\%Solubilidad = \frac{(masa\ seca\ inicial - masa\ seca\ final)}{masa\ seca\ inicial} * 100 \quad (1.12)$$

1.7.6 Análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía es una técnica donde se observa y analiza la transición de un determinado analito o muestra en su estado fundamental a un estado de mayor energía dada a través de un espectro generado por el espectrómetro. La diferencia de energía la provee la luz con la que será irradiado el sistema. La región del espectro

electromagnético que comprende la radiación infrarroja se puede dividir en infrarrojo cercano, lejano y medio, los cuales son responsables de transiciones vibracionales en los diferentes enlaces moleculares.

En las moléculas más simples, diatómicas, las vibraciones corresponden a los estiramientos (modificación de la longitud del enlace) y en moléculas más complejas se producen, además, deformaciones (modificaciones en los ángulos de los enlaces). En los alimentos se tendrán moléculas con gran cantidad de átomos como pueden ser proteínas, grasas o carbohidratos, donde el modelo del oscilador armónico no resulta fácil de analizar y se realiza una aproximación.

Los espectros obtenidos por esta técnica se observan como la transmitancia en función de la frecuencia. Un 100% de transmitancia representa la transmisión total de la luz sin absorción. Cuando se produce absorción, la transmitancia disminuye. Estos espectros en el infrarrojo son un continuo, y no un conjunto de líneas discretas, porque las transiciones vibracionales tienen asociadas transiciones rotacionales.

Los avances más significativos en la técnica llegaron como resultado de la introducción de la Transformada de Fourier. Se requiere un interferómetro a partir del cual y se generan los espectros a través de un proceso matemático. La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) solucionó el problema de la intensidad de la fuente, minimizó el tiempo para adquirir la información e incrementó considerablemente la calidad de los espectros infrarrojos por suma de múltiples espectros.

En particular, para los carbohidratos, existen zonas en los espectros (**Figura 1.9**) de gran interés que han sido caracterizadas. Una banda ancha alrededor de 3300 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento de grupos O–H libres o unidos por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, un pico alrededor de 2930 cm^{-1} asignado al tramo del enlace C–H, una señal a 1650 cm^{-1} ligada a la flexión O–H del agua en el almidón (agua ligadas a la estructura) y las bandas en el rango de 1300 a 900 cm^{-1} asociadas a los enlaces de estiramiento de C–O y C–C del anillo de anhidroglucosa, siendo esta zona más sensible a la conformación molecular (Vicentini y col., 2005).

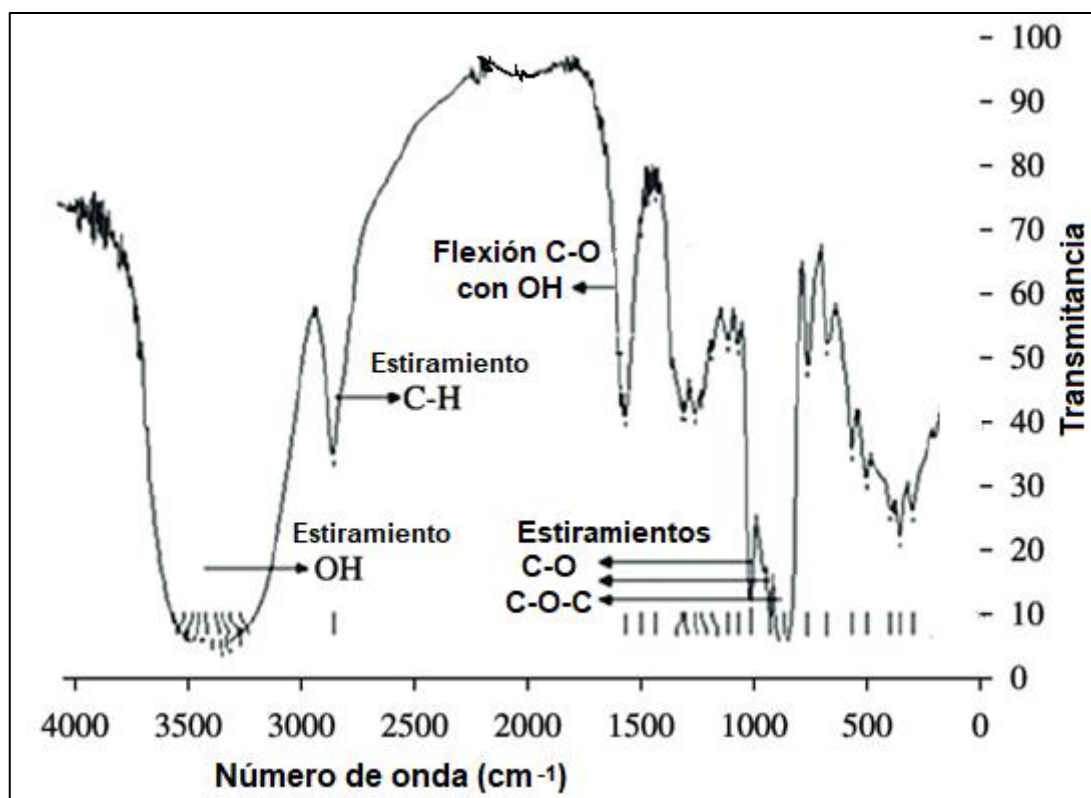


Figura 1.9- Espectro FTIR típico del almidón con bandas características (Adaptado de Valero, 2013).

1.7.7 Propiedades térmicas

El análisis térmico comprende una amplia gama de técnicas analíticas que miden propiedades físicas y químicas en función de la temperatura y el tiempo en una dada atmósfera. Permite analizar cambios de masa, temperaturas de cambios de fase y estado y comportamiento mecánico en función de la temperatura y el tiempo.

a) Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica donde se analiza el flujo de calor que experimenta una muestra. En el equipo se coloca como referencia un crisol o cápsula con aire. La muestra se coloca en otro crisol y un conjunto de sensores determina el flujo de calor que se le entrega o libera respecto a la referencia a una presión constante. Se selecciona en el equipo la velocidad de calentamiento y temperatura, y este registra que debe calentar la muestra y la referencia a esa temperatura (conexión a termocuplas).

Si los procesos son exotérmicos (de desorden a orden, curvas hacia arriba) se va a entregar menos calor: Cristalización (T_c), retrogradación del almidón, agregación de proteínas.

Si los procesos son endotérmicos (de orden a desorden, curvas hacia abajo) se va a entregar más calor: Fusión (T_m), gelatinización del almidón (requiere de una mínima proporción agua/almidón mayor a 2:1), desnaturalización de proteínas.

La integral del pico (área bajo la curva) corresponde a la variación de entalpía total del proceso expresada en J/g.

Por otro lado, la transición vítrea es un cambio de estado sin cambio de fase, en el cual se modifica la capacidad calorífica del material (ΔC_p).

En la **Figura 1.10** se muestra un ejemplo de un termograma obtenido por DSC.

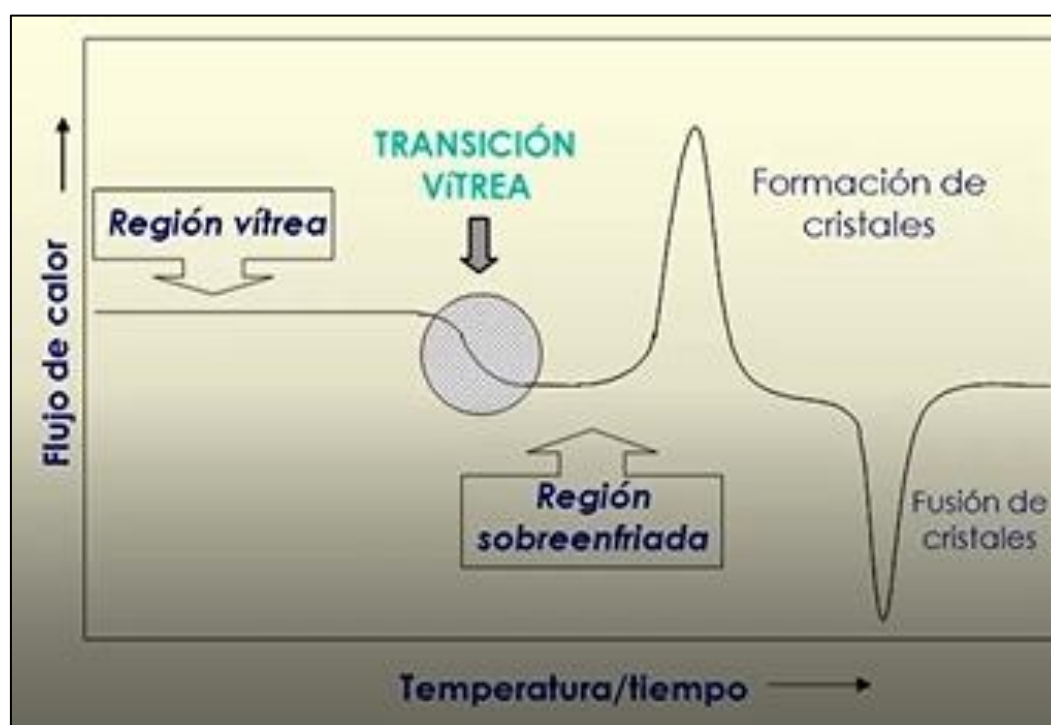


Figura 1.10- Calorimetría diferencial de barrido: Termograma típico de un azúcar liofilizado (adaptado de Roos, 1992).

b) Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico es una técnica donde se analiza el cambio de masa en función del calentamiento de la muestra. El equipo consiste en una termobalanza de gran precisión y alta sensibilidad que mide el cambio de masa con muy poca muestra en una atmósfera controlada y frente a una referencia. Los resultados se registran en un

termograma (pérdida de peso vs temperatura). Para mejor observación de los cambios que ocurrieron en la muestra durante el proceso, puede representarse el diferencial (primera derivada). De esta manera, se observan picos que caracterizan las distintas zonas, de deshidratación y de descomposiciones. En la **Figura 1.11**, la primera zona (alrededor de 100 °C) representa la pérdida de agua, y las siguientes zonas corresponden a diferentes eventos de la descomposición de la muestra.

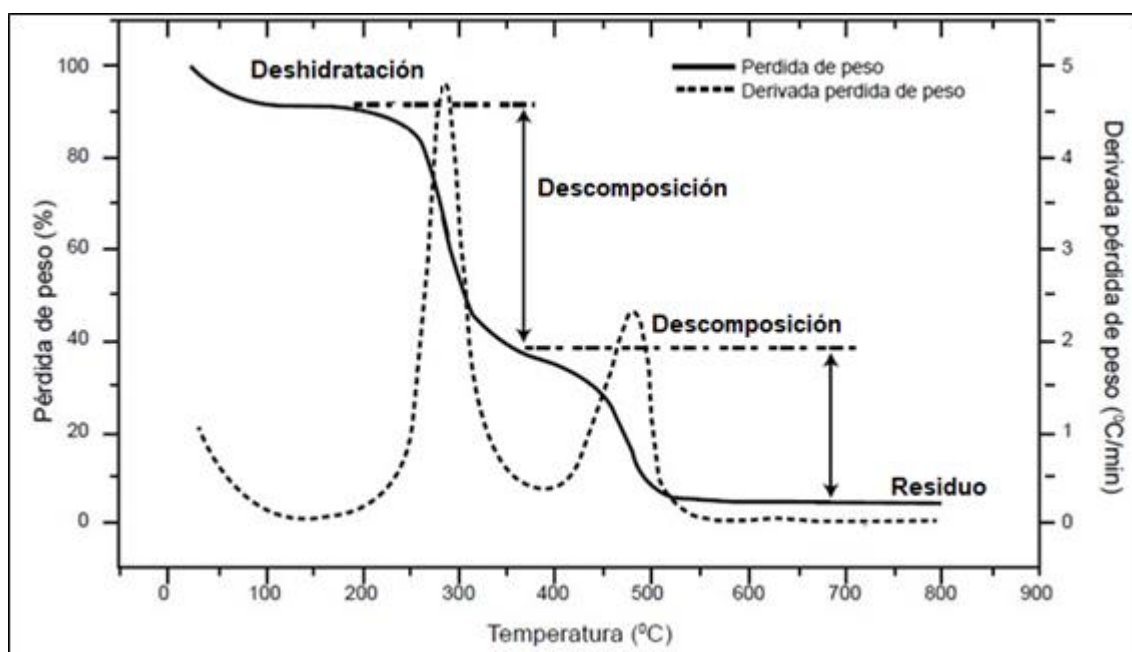


Figura 1.11 – Ejemplo de termograma con zonas características (Adaptado de Lucas y col., 2013).

1.8 Caracterización microscópica de las películas

La microscopía se define como el conjunto de métodos y técnicas para hacer visible los objetos que el ojo humano no alcanza a ver, dado que se encuentran fuera de su resolución. Puede utilizarse para el estudio del estado físico y las transiciones de los alimentos, para caracterizarlos y para detectar contaminantes.

1.8.1 Microscopía óptica

La Microscopía óptica emplea radiación electromagnética en el espectro visible, entre 340-780 nm, que se desvía mediante lentes (de vidrio o cuarzo). Puede ser de campo claro, de campo oscuro, con contraste de fase o de fluorescencia (en este último caso, un filtro selecciona una única longitud de onda que va a incidir sobre la muestra la

cual va a fluorecer). Es una de las microscopías más utilizadas con una resolución ≥ 0.2 μm . Siendo la resolución la mínima distancia en la que deben estar separados los objetos para poder distinguirse. La resolución es, proporcional a la longitud de onda e inversamente proporcional al índice de refracción.

Para mejorar y ampliar su aplicación pueden utilizarse aceites de inmersión (aumenta índice de refracción del medio), tinciones y filtros (aumenta el contraste, acentúan las características morfológicas y mejoran la identificación), luz polarizada (para ver zonas cristalinas/birrefringencia por diferencia de densidades, útil en el análisis de azúcares, sales, almidón, gomas, proteínas), contraste de fases o contraste de interferencias (Hawkes y Spence, 2019).

1.8.2 Microscopía electrónica

La Microscopía electrónica emplea radiación de electrones a alta velocidad que se desvía mediante campos magnéticos o eléctricos (se utilizan bobinas y los haces se aceleran por medio de un potencial positivo). Puede ser de transmisión (TEM, transmisión de electrones, requiere un corte muy fino de la muestra seca de un determinado espesor y homogéneo), de barrido (SEM, reflexión de electrones) o SEM-ESEM (microscopía de barrido electrónico ambiental, sólo para muestras deshidratadas y útil para minimizar los cambios en las muestras durante su preparación). La resolución de este tipo de microscopía resulta ≥ 0.001 μm . En lugar de lentes se cuenta con serpentines electrónicos que generan un campo electromagnético y el rayo es enfocado por medio de un condensador. Luego pasa a través del objeto donde es parcialmente deflectado. El grado de deflexión depende de la densidad electrónica en la muestra (a mayor masa atómica, mayor deflexión). La superficie de la muestra es metalizada (oro, osmio o platino) para generar los electrones secundarios que puedan desprenderse fácilmente y que luego serán registrados. Se pueden observar perfectamente las paredes celulares y los espacios intercelulares, cuantificar espesores y realizar análisis respecto a cinéticas de secado o colapso (Hawkes y Spence, 2019).

1.9 Actividad antimicrobiana de películas y recubrimientos

1.9.1 Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)

La determinación de las zonas de inhibición (halos) en el desarrollo de un microorganismo, sembrado sobre un medio de cultivo sólido favorable para su

desarrollo, resulta ser una de las técnicas más exploradas en cuanto a disponibilidad de un antimicrobiano (Lim y col., 2010).

Como se muestra en la **Figura 1.12.a)**, la técnica consiste en apoyar sobre la superficie inoculada (placas con agar y césped con los microorganismos que se desean analizar) discos de las películas a estudiar. Luego, se colocan las placas en refrigeración por 48h y se procede a la incubación a 37 °C por 24 h. En el caso que el antimicrobiano se encuentre disponible, y actúe frente al microorganismo evaluado, se observará una zona clara de no crecimiento alrededor de los discos de película, como se muestra en la **Figura 1.12.b)**. Esta zona clara representa al halo de inhibición y será un indicador de la difusión del antimicrobiano desde la película hacia el agar, y de su actividad (Lim y col., 2010).

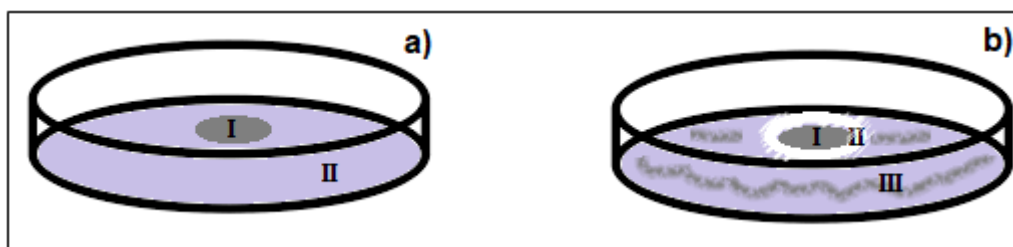


Figura 1.12- Esquema de ensayo del estudio de la liberación de los antimicrobianos desde la película hacia un sistema modelo sólido. a) Tiempo inicial: placa de Petri conteniendo agar inoculado (II) y disco de película comestible apoyado sobre el agar (I), y b) Tiempo final: placa de Petri conteniendo disco de película comestible (I), halo de inhibición debido a la acción de los antimicrobianos difundidos (II) y césped de microorganismo (III).

1.9.2 Estudio de la actividad de Barrera a la contaminación en alimentos

Esta prueba permite evaluar la capacidad de la película para evitar la contaminación externa de los alimentos impidiendo su paso a la superficie de los mismos y/o reduciendo las células viables de microorganismos indeseables. En particular, en la presente investigación, la película se evalúa sobre un alimento modelo semisólido (agar PCA) y sobre queso Port Salut argentino de *La Serenísima*. Se opta por un queso de mediana humedad, ampliamente consumido por los argentinos, de buena calidad y que puede presentar signos de deterioro y contaminación por acción microbiana durante su almacenamiento aun conteniendo un antimicrobiano, el sorbato de potasio, en su formulación (https://www.laserenisima.com.ar/producto_67_portasalutaclsico).

1.9.3 Estudio de la Difusión de los antimicrobianos en alimentos

La prueba de difusión se utiliza para determinar el efecto antimicrobiano de las películas sobre los microorganismos estudiados a través de la liberación del antimicrobiano desde la película hacia un sistema modelo o un alimento. Es decir, se evalúa la disponibilidad de estos.

Objetivos

Objetivos generales

- ✓ Estudiar y desarrollar, en sus aspectos básicos y aplicados, procesos que permitan obtener alimentos más naturales y seguros.

Objetivos específicos

- ✓ Desarrollar películas comestibles reforzadas a base de almidón de mandioca con agregado de fibras naturales provenientes de desechos industriales utilizando la técnica de Casteo.
- ✓ Estudiar las propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímica (color, permeabilidad al vapor de agua y el oxígeno y solubilidad en agua), propiedades térmicas y biodegradabilidad de las películas comestibles compuestas desarrolladas.
- ✓ Investigar el efecto del agregado de antimicrobianos naturales (natamicina y nisina) sobre las propiedades de las películas desarrolladas.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de las películas comestibles compuestas formuladas, en sistemas modelos y queso Port Salut, a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.
- ✓ Desarrollar recubrimientos comestibles a base de almidón de mandioca con agregado de fibras naturales provenientes de desechos industriales y/o antimicrobianos naturales.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos comestibles formulados sobre queso a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.
- ✓ Desarrollar películas comestibles a base de almidón de mandioca conteniendo antimicrobianos naturales mediante la técnica de termo-compresión.
- ✓ Estudiar las propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímica (color, permeabilidad al vapor de agua y el oxígeno, y solubilidad en agua) y

propiedades térmicas de las películas comestibles desarrolladas por termo-compresión y compararlas con aquellas desarrolladas por casteo.

- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de las películas comestibles termoformadas, en sistemas modelos y queso Port Salut, a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.

CAPITULO 2

Elaboración y caracterización de recubrimientos y películas comestibles antimicrobianos y reforzados con salvado de arroz

1 Introducción

Una novedosa e interesante fuente de fibra natural puede encontrarse en el salvado de arroz, uno de los sub-productos del arroz comercial luego del proceso de blanqueo (donde se separa el salvado). Se conoce que el salvado de arroz representa alrededor de un 10% del peso del grano y contiene grasa, almidón y proteínas de buena calidad. Dependiendo de la variedad de arroz y tipo de procesamiento, el salvado de arroz contiene alrededor de un 15-20% de grasa, 12-16% de proteína, 23-28% de fibra y 7-10% de ceniza (Fu y col., 2017, Kargarzadeh y col., 2017). Este residuo rico en fibra es de gran valor comercial en alimentación animal. Sin embargo, para aprovechar aún más este sub-producto, diferentes aplicaciones han sido propuestas que incluyen la incorporación como relleno en películas a base de biopolímeros siendo de gran interés en la actualidad. Cano y col. (2014) evaluaron el efecto de la relación amilosa:amilopectina y la adición de salvado de arroz sobre las propiedades mecánicas de películas de almidón. Obtuvieron películas más resistentes a la ruptura y menos extensibles y una mejora del módulo elástico cuando utilizaron salvado de arroz con un tamaño de partícula inferior a 57 μm . Hacen falta más estudios para comprender cómo la presencia del salvado de arroz afecta las propiedades fisicoquímicas, estructurales y antimicrobianas de las películas y recubrimientos comestibles.

Objetivos

En el presente capítulo, el salvado de arroz fue utilizado como relleno para generar matrices de almidón compuestas.

Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Estudiar las propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímica (color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua) de las películas comestibles compuestas desarrolladas.
- ✓ Investigar el efecto del agregado de antimicrobianos naturales (natamicina y nisina) sobre las propiedades de las películas desarrolladas.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de las películas comestibles compuestas formuladas, en sistemas modelos y queso Port Salut argentino frente a una contaminación simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*, a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.
- ✓ Desarrollar recubrimientos comestibles a base de almidón de mandioca con agregado de salvado de arroz procesado y/o antimicrobianos naturales.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos comestibles compuestos en queso Port Salut argentino frente a una contaminación simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

El almidón de mandioca fue proporcionado por Bernesa S.A. (Lomas de Zamora, Argentina) y el glicerol por Mallinckrodt (Buenos Aires, Argentina). La natamicina comercial (Delvolid® Salt) y la nisina comercial (Nisin®) fueron proporcionadas por DSM (Heerlen, Países Bajos). Los reactivos químicos fueron de grado analítico.

2.2 Tratamiento del salvado de arroz

El tratamiento del salvado de arroz se llevó a cabo partiendo de salvado de arroz en forma de polvo proveniente de la Cooperativa Arroceros Villa Elisa (Entre Ríos, Argentina). A fin de adecuar la calidad del salvado, se procedió a eliminar impurezas y microorganismos de la materia prima. Se colocaron alrededor de 50 g de muestra en un vaso de precipitados de un litro con 500 g de agua, agitando continuamente en agitador magnético. Se observó la formación de espuma en la superficie y partículas en suspensión (impurezas) que fueron retiradas con espátula. La suspensión se distribuyó en 12 tubos Falcon que fueron autoclavados y luego centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a 20 °C. A continuación, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril, intercalados con centrifugación. Los pellets fueron liofilizados utilizando un equipo Christ 1–4 LD (Alemania) y se obtuvo un polvo muy fino pero compactado. Posteriormente las muestras fueron tratadas con un mortero y luego procesadas en un molinillo de café doméstico (Connoisseur®, Coquette), obteniéndose un polvo listo para ser tamizado (tamices Zonitest Rey & Ronzoni SRL, Argentina). Como resultado, se lograron tres fracciones: entre 420 μm y 210 μm ; entre 210 μm y 105 μm y menores a 105 μm . Esta última fracción fue la utilizada para ser caracterizada y para la fabricación de películas compuestas.

Aplicación de ultrasonido en salvado de arroz

El salvado de arroz procesado (PRB) se sometió a ultrasonido a fin de reducir aún más el tamaño de partícula. Se utilizó un Equipo VCX-750, Sonics Vibra Cell (USA) con un baño de hielo para controlar que la temperatura no supere la temperatura ambiente, durante 15, 20 y 30 minutos con una amplitud del 80% utilizando una punta de titanio de 13 mm.

Si bien se aplicó el tratamiento de ultrasonido al salvado, la constitución de películas a base de almidón con salvado de arroz sonificado en diferentes concentraciones no fue posible. El agregado de este refuerzo sonificado dio como resultado películas heterogéneas por impedimento de la constitución de la matriz.

2.3 Caracterización del salvado de arroz crudo y procesado. Contenido proximal

2.3.1 Humedad.

El contenido de humedad se determinó utilizando una estufa de vacío a 100 °C por 24 h (AOAC 934.01-2005). La determinación se realizó por duplicado.

2.3.2 Cenizas

Con el objetivo de determinar el contenido de cenizas se realizó la calcinación en mufla a 500 °C (O.R., modelo: Apolo, Argentina) (AOAC 942.05 - 17 ed.) durante 8 h. La determinación se realizó por duplicado.

2.3.3 Contenido de proteínas

El contenido de proteína se determinó utilizando el método colorimétrico de Lowry, (Lowry, Rosebrough, Farr, y Randall, 1951). En una primera etapa se trató la muestra con ácido sulfúrico al 72% durante 4 h en un baño a 100 °C para favorecer la extracción de las proteínas por hidrólisis y luego se realizó la neutralización con granallas de NaOH. La determinación se realizó por duplicado.

Inicialmente se preparó la curva de calibración a partir del estándar de albúmina de suero bovino, BSA, (Sigma, USA). Se prepararon un tubo blanco de reactivos y cuatro tubos muestra con el extracto neutralizado en la etapa anterior (dos diluciones 1/10 y dos 1/20). Luego de las reacciones con Reactivo A: Na₂CO₃ 2% en 0,1% NaOH con tartrato de sodio y potasio 2% y sulfato cúprico al 1% y Reactivo B: Reactivo de Folin Ciocalteau, se colocaron ~1000 µl de cada tubo en una cubeta plástica adecuada para el espectrofotómetro y se midió la absorbancia a $\lambda=660$ nm. A partir de la curva de calibración se determinó el contenido de proteínas en relación con la absorbancia medida. El resultado se expresó en porcentaje en gramos de proteínas por cada 100 gramo de salvado.

2.3.4 Contenido de grasa

El contenido de grasa se determinó de acuerdo con el método Soxhlet, un método de extracción múltiple con éter de petróleo. Posteriormente a la evaporación del solvente (éter), se pesó el residuo graso restante (AOAC 960.39, 2005).

Inicialmente se pesó una cantidad adecuada de muestra en un cristizador y se secó en una estufa de vacío a 70 °C. Se transfirió cuantitativamente el material deshidratado a un cartucho de celulosa (2-3 g) y se colocó en el cuerpo del Extractor Soxhlet (**Figura 2.2**).

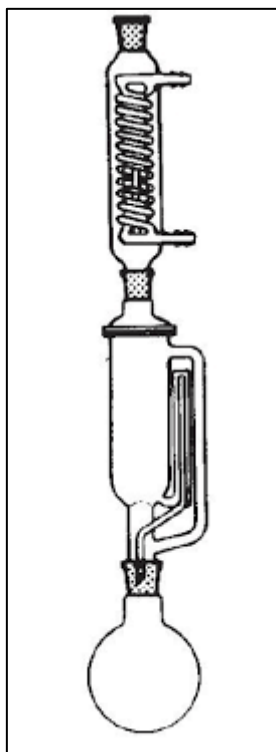


Figura 2.2 – Esquema del Extractor Soxhlet

En el balón de extracción se colocaron 2 o 3 piedras pómez chicas y se cargó el cuerpo del extractor una vez y media con éter de petróleo. Se realizó la extracción durante 4 h calentando de manera de lograr una velocidad de condensación de 5 ó 6 gotas por segundo.

Una vez finalizada la extracción, se destiló la mayor parte del solvente en rotavapor a presión reducida y a temperatura controlada de 40 °C para su recuperación. Se pasó luego el residuo graso concentrado obtenido a un Erlenmeyer chico tarado, con la ayuda de un poco de solvente. Se evaporó el solvente restante a baño María a 40 °C y se secó a 60 °C durante 30 min. Se enfrió y se pesó. El resultado se expresó como porcentaje.

2.3.5 Fibra dietaria insoluble

Para determinar la fibra dietaria insoluble se utilizó el método por detergente neutro (AOAC 991.42-1998).

Se pesaron exactamente 0,15 – 0,3 g de muestra y se colocaron en Erlenmeyer esmerilado de 250 mL. Luego se incorporaron, respetando el siguiente orden:

- I. 100 mL de detergente neutro
- II. 10 gotas de antiespumante
- III. 0,5 g de sulfito de sodio anhidro

A continuación, se conectó el Erlenmeyer a un condensador (refrigerante con mangueras conectado a agua de la canilla) y se procedió con el calentamiento (ebullición en 5 - 10 minutos). Se controló el calentamiento para evitar formación de espuma en gran cantidad, y se mantuvo por 60 minutos agitando periódicamente (para resuspender sólidos adheridos a las paredes). Se filtró inmediatamente a través de un embudo Buchner con papel de filtro previamente tarados y se conectó a un kitasato de 250 mL con tapón de goma perforado conectado a una bomba de vacío y se redujo la presión lentamente para facilitar el filtrado. Se lavó el Erlenmeyer con unos pocos mililitros de agua caliente (80 – 90 °C), se filtró y succionó hasta sequedad (3 veces). Luego se lavó con 5 mL de acetona (2 veces) y succionó hasta sequedad. Finalmente se secó el embudo con el papel de filtro por 8 h en estufa a 60 °C y se pesó para calcular el porcentaje de fibra con la siguiente **ecuación (2.1)**:

$$\%fibra: \frac{(peso\ Buchner+fibra) - (peso\ Buchner)}{peso_{inicial\ muestra}} 100\% \quad (2.1)$$

2.3.6 Carbohidratos

La determinación de los carbohidratos se realiza por diferencia, restando al 100%, el porcentaje de los demás componentes.

2.4 Distribución del tamaño de partícula del salvado de arroz procesado

La determinación se realizó a temperatura ambiente mediante dispersión de luz estática utilizando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra) provisto de un láser He – Ne (λ : 633 nm). La distribución de tamaño se describió utilizando los diámetros (μm) $d(0,1)$, $d(0,5)$ y $d(0,9)$. Estos valores indican que el 10%,

50% y 90% de la población acumulada corresponde a partículas con un diámetro menor que $d(0,1)$, $d(0,5)$ y $d(0,9)$ respectivamente. Adicionalmente, se obtuvieron el diámetro medio ponderado en superficie $D [3,2]$ (diámetro de Sauter, μm) y el diámetro medio ponderado en volumen $D [4,3]$ (diámetro de De Brouckere, μm), **ecuaciones 2.2 y 2.3**. Las diferencias entre estos diámetros indican que las distribuciones granulométricas son amplias o que tienen forma irregular (Cano y col., 2014).

$$D [3,2] = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2.2)$$

$$D [4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2.3)$$

Donde n_i corresponde al número de partículas y d_i al diámetro correspondiente.

2.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó un espectrómetro IR (Bruker Vector 22) para registrar los espectros FTIR, en el rango de frecuencia de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Las muestras fueron previamente secadas en desecador con sílica gel.

2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La tecnología de microscopía electrónica de barrido se utilizó para observar la morfología de las partículas de salvado de arroz procesado, utilizando un microscopio Zeiss Supra 40 (Carl Zeiss, Alemania). Las muestras se secaron en CaCl_2 y luego se montaron en un taco de bronce y se recubrieron por pulverización catódica (Cressington Scientific Instruments Sputter Coater, Reino Unido) con una capa de oro antes de la obtención de imágenes (Alzate y col., 2017).

2.7 Preparación de los sistemas

a) Preparación de las películas con salvado de arroz

Se prepararon diferentes mezclas de almidón, glicerol, agua, conteniendo o no los antimicrobianos naturales natamicina (Devocid Salt® de DSM, Holanda) y nisina (Nisin® de DSM, Holanda) y/o salvado de arroz procesado. La composición de las mezclas se muestra en la **Tabla 2.1.a**. Se adicionó la cantidad de agua correspondiente

para completar los 100 mL de mezcla (slurry). Las películas C y CNANI se constituyeron como películas control. En todos los casos, la gelatinización del almidón se realizó a una velocidad constante de $\sim 1.5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$, alcanzando una temperatura final de entre 82-90 $^\circ\text{C}$.

Se aplicó vacío para eliminar el aire del gel cuando fue necesario. Para la formación de las películas, la suspensión se dispensó en alícuotas de 14 g en moldes de 7 cm de diámetro. El secado se realizó a 40 $^\circ\text{C}$ durante 16-18 h en una cámara de convección forzada. Una vez constituidas, se desprendieron de los moldes y, antes de evaluar sus propiedades, se acondicionaron en desecador a 28 $^\circ\text{C}$, con una solución saturada de NaBr (actividad de agua ≈ 0.575) durante 7 días. El diagrama del proceso de fabricación de las películas se muestra en la **Figura 2.3**.

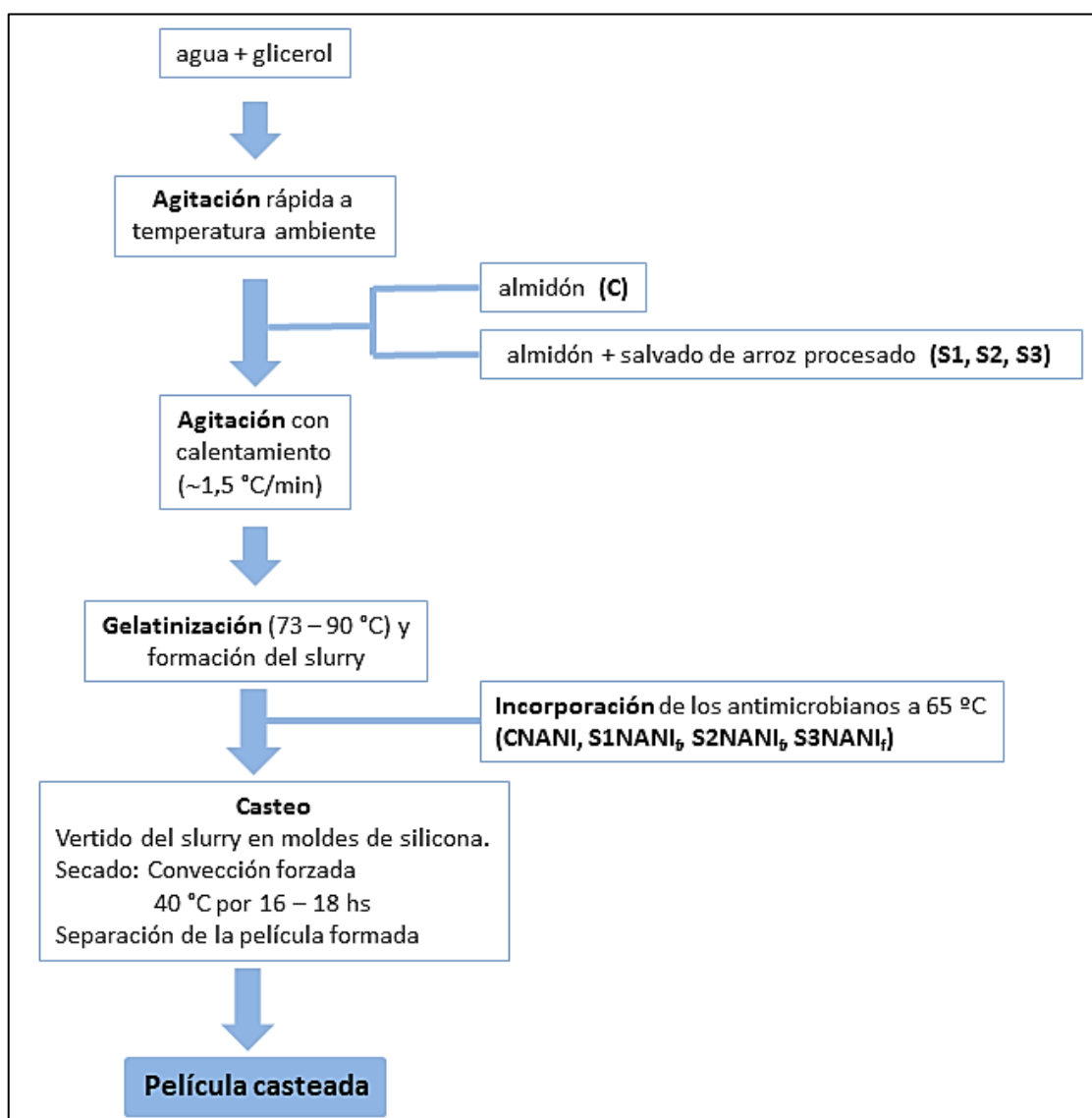


Figura 2.3- Diagrama de flujo Elaboración de películas por casteo.

Tabla 2.1.a- Composición de diferentes películas basadas en almidón de mandioca y PRB con adición o no de natamicina y nisina como antimicrobianos naturales (en g/100mL de slurry).

sistema	Almidón	glicerol	PRB	natamicina	nisina
C	5	2	---	---	---
CNANI	5	2	---	0,0068	0,027
S1	5	2	0,1	---	---
S2	5	2	0,2	---	---
S3	5	2	0,3	---	---
S1NANI_f	5	2	0,1	0,0068	0,027
S2NANI_f	5	2	0,2	0,0068	0,027
S3NANI_f	5	2	0,3	0,0068	0,027

El subíndice “f” refiere a film (películas).

b) Preparación de los recubrimientos con salvado de arroz

Se prepararon diferentes mezclas de almidón, glicerol, agua, antimicrobianos naturales y PRB. La composición de estos sistemas se muestra en la **Tabla 2.1.b**. Se adicionó la cantidad de agua correspondiente para completar los 100 mL de slurry.

Tabla 2.1.b- Composición de los diferentes recubrimientos basados en almidón de mandioca y salvado de arroz con adición de natamicina y nisina como antimicrobianos naturales (en g/100mL de slurry).

sistema	almidón	glicerol	PRB	natamicina	nisina
S2NANI_c	5	2	0,2	0,0068	0,027
S2NANI2_c	5	2	0,2	0,0136	0,054
S2NANI3_c	5	2	0,2	0,0204	0,081

El subíndice “c” refiere a coating (recubrimientos).

Los recubrimientos se constituyeron directamente sobre trozos de queso (2,5 x 2,5 x 1,2 cm; 9,0 ± 0,5 g). El sistema S2NANI_c contiene la misma concentración de

antimicrobianos en comparación con la película S2NANI_f. El número 2 adicional en S2NANI2_c y 3 en S2NANI3_c indica que tales sistemas contienen una concentración de dos y tres veces mayor a la suspensión que originó la película S2NANI_f respectivamente. Estas concentraciones se seleccionaron a fin de encontrar una concentración de antimicrobianos con actividad efectiva equivalente a la observada en S2NANI_f. Los trozos de quesos se sumergieron en cada suspensión durante 10 segundos, se escurrieron durante aproximadamente 10 segundos y se colocaron en un horno de secado con convección forzada a 40 ± 1 °C durante 30 minutos para la constitución del recubrimiento en la superficie. El diagrama del proceso de recubrimiento se muestra en la **Figura 2.4**. Adicionalmente, se pesaron los quesos antes y después de ser recubiertos para estimar la cantidad de cobertura adherida sobre la superficie del queso.

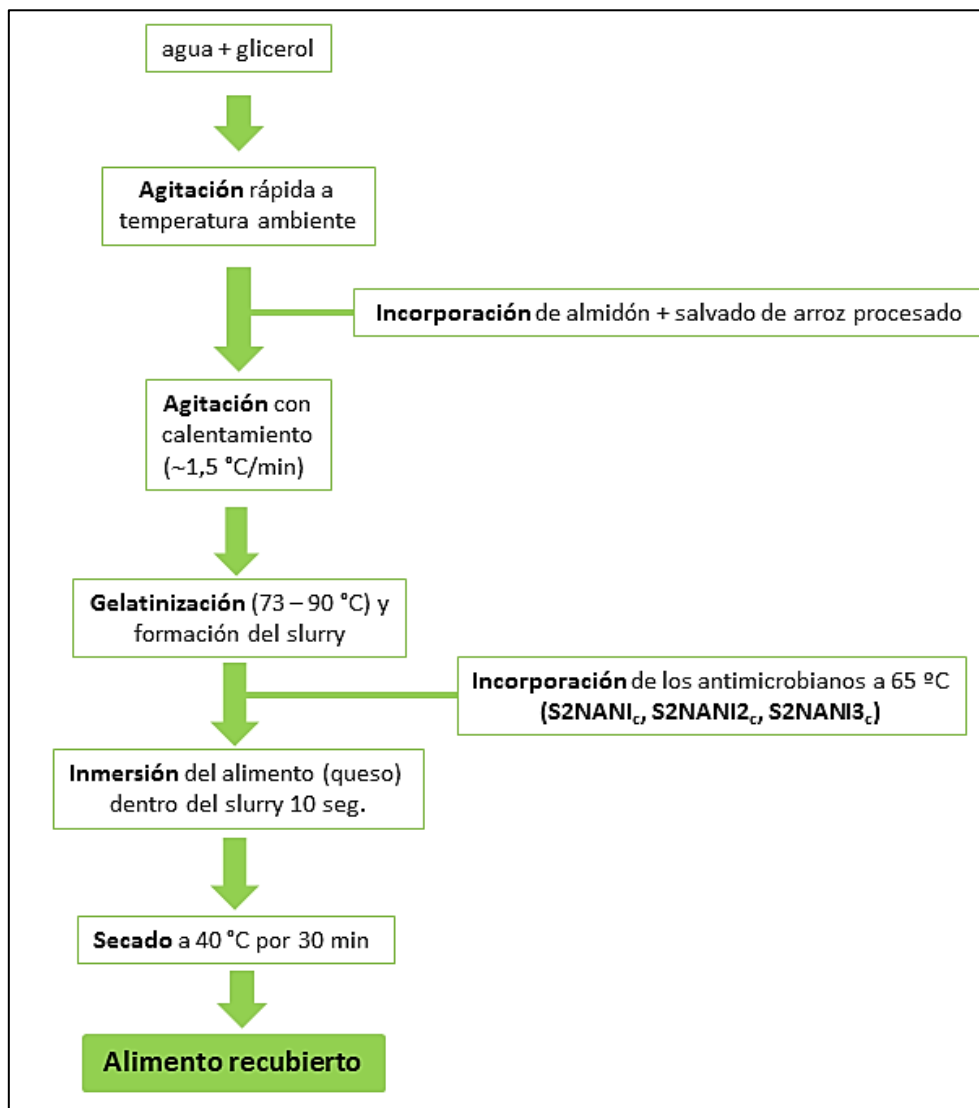


Figura 2.4- Diagrama de flujo Elaboración de recubrimientos.

2.8 Caracterización fisicoquímica de las películas comestibles

2.8.1 *Espesor*

Se midió el espesor de las películas en al menos tres posiciones diferentes utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón) con una precisión de 0,01 mm. Estos datos fueron requeridos para los cálculos de la permeabilidad al vapor de agua y del esfuerzo a la tracción de las películas.

2.8.2 *Propiedades mecánicas: ensayos de tracción*

El ensayo de tracción se realizó con una máquina universal de testeo (Instron modelo 3345, Instron Ltd., EE. UU. o texturómetro Stable Micro System TA, XT plus, Haslemere, Inglaterra) siguiendo el método estándar ASTM D882-02 (ASTM, 2002). Previamente, se midió el espesor de las muestras. Las distintas películas, equilibradas a una humedad relativa de 57% y cortadas en tiras de 60 mm x 6 mm, se montaron en mordazas con una separación inicial de 20 mm y se estiraron a 50 mm/min hasta la ruptura. Se obtuvieron las curvas de fuerza en función del desplazamiento y se transformaron en curvas de esfuerzo en función de la deformación de acuerdo con las **ecuaciones 1.1 y 1.2** mencionadas en el **Capítulo 1 sección 1.7.1**.

Adicionalmente, para el salvado de arroz procesado, se obtuvo la relación de aspecto $\left(\frac{l}{e}\right)_c$ según se detalló en el **Capítulo 1 sección 1.7.1**

2.8.3 *Color*

Para realizar las determinaciones de color se colocaron las películas sobre fondo blanco estándar (Trezza y Krochta, 2000). Se midió con un colorímetro modelo CM-508d (Minolta, Tokio, Japón) usando una abertura de 1,5 cm de diámetro.

El área expuesta fue lo suficientemente grande con respecto a la zona iluminada para evitar cualquier efecto de entrada de luz. Los parámetros CIELab: L*, a* y b*, y el índice de amarillo (YI) se evaluaron de acuerdo con un método estandarizado (ASTM D 1925, 1995) en, por lo menos, tres posiciones seleccionadas al azar en cada muestra.

Los cálculos fueron realizados para un iluminante D-65 y un observador de 2°.

2.8.4 *Permeabilidad al vapor de agua (PVA)*

La permeabilidad al vapor de agua de las películas se determinó gravimétricamente a 25 °C utilizando el procedimiento especificado por ASTM E9600 (2000) modificado.

Para la determinación de la PVA se utilizaron celdas de permeación de acrílico, con un diámetro interno de 4,4 cm y diámetro externo de 8,4 cm, resultando en un área expuesta de 15,205 cm²; y 3,5 cm de profundidad.

En el interior de cada celda se colocó CaCl₂ dejando libre no menos de 1 cm en la parte superior para evitar cualquier contacto accidental entre la película y el desecante. De esta manera se generó una atmósfera de 0 % H.R dentro de la celda, es decir, ≈ 0 Pa de presión parcial de vapor de agua. Se ubicó cada película en la parte superior de la celda y se colocó la tapa ajustándola con cuatro tornillos mariposa. Para asegurar un buen cierre, se utilizaron sellos de caucho y grasa de vacío. Posteriormente, las celdas de permeación se pesaron y luego se colocaron en una cámara con temperatura y humedad relativa controladas (Ibertest, España), las cuales fueron ajustadas a 25 °C y 70% H. R.

Después de 16-20 horas aproximadamente, se alcanzó una tasa de transmisión de vapor de agua estacionaria y, desde ese momento, se registraron periódicamente los cambios en el peso de la celda de permeación durante un período de 48 h. Los cambios de peso se registraron mediante una balanza granataria y a partir de estos se calculó la PVA de acuerdo con la **ecuación 1.10** descrita en el **Capítulo 1 sección 1.7.3**. Todas las pruebas se llevaron a cabo por duplicado.

2.8.5 Solubilidad en agua

Se cortaron discos de película de 2 cm de diámetro y se pesaron en balanza analítica por duplicado para cada sistema. Luego se secaron en una estufa de vacío a 100 °C durante 24 horas a fin de determinar su masa seca inicial. Por otro lado, se prepararon y pesaron discos de 2 cm de diámetro y cada uno se colocó en un recipiente conteniendo 50 mL de agua destilada a 25 °C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, las películas se retiraron de los recipientes y se secaron de la manera previamente descrita para poder calcular la masa seca final luego del tratamiento en agua.

La solubilidad se calculó mediante **ecuación 1.12** descrita en el **Capítulo 1 sección 1.7.5**.

2.8.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó un espectrómetro FTIR (V5.3.1 Spectrum, Perkin Elmer Inc., USA) provisto de un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) para registrar los

espectros, en el rango de frecuencia de 4000–400 cm^{-1} (resolución de 2 cm^{-1}). Las muestras fueron previamente secadas en desecador con sílica.

2.8.7 Microestructura de las películas comestibles

Se realizó microscopía óptica (Olympus BX43, Japón) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar la morfología de la superficie de la película y de la sección transversal (Ollé Resa y col., 2014).

a) Microscopía óptica

Con el objetivo de evaluar la morfología que presentaban las diferentes películas, se cortaron fragmentos de películas; luego, los cortes se colocaron entre porta y cubreobjeto con una gota de agua destilada y se observaron con diferentes aumentos en un microscopio óptico (Olympus ® BX43, Japón). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Q-color 3C) y luego se estudiaron con un programa analizador de imágenes (Qcapture Pro ® 6.0, QImaging, Canadá).

b) Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis microestructural de las secciones transversales de las películas se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de barrido electrónico ambiental (ESEM). Las muestras fueron secadas previamente en CaCl_2 . Las películas se congelaron con nitrógeno líquido y se fracturaron en piezas de 5 x 10 mm^2 aproximadamente. Luego, se fijaron en el soporte del microscopio con un ángulo de 90° a la superficie lo que permitió la observación de su sección transversal. Se observaron las películas usando un voltaje de aceleración de 10 kV.

2.9 Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos comestibles

Condiciones de crecimiento de microorganismos y preparación de un cultivo mixto

Se preparó un inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* (CBS1171, Global Catalog of Microorganisms, Rotterdam, Países Bajos) en 150 mL de caldo Sabouraud (Biokar Diagnostic, Francia), a 28 °C con agitación constante y temperatura controlada durante aproximadamente 18 h hasta obtener la densidad óptica correspondiente a la densidad poblacional inicial deseada, verificada por densitometría (λ : 630 nm), de acuerdo con la curva de crecimiento de la levadura (inóculo de 10^7 - 10^8 UFC/mL).

En el caso de *Listeria innocua* (CIP80.11, Colección Internacional del Instituto Pasteur, París, Francia), se cultivó en 150 mL de caldo de triptona de soja con extracto de levadura (TSBYE, Biokar Diagnostics, Francia) a 28 °C en un agitador con temperatura controlada y agitando continuamente durante la noche. Luego, se agregaron 2 mL del caldo de cultivo crecido sobre TSBYE fresco y se agitó aproximadamente 1 h a ~ 28 °C hasta que se alcanzó la concentración celular deseada, verificada por densitometría (λ : 540 nm), de acuerdo con la curva de crecimiento de la bacteria (inóculo de 10^7 - 10^8 UFC/mL).

Posteriormente, se preparó un cultivo mixto, conteniendo ambos microorg. Para ello, volúmenes iguales de los cultivos individuales (1:1 v/v.) fueron mezclados y homogenizados.

2.9.1 Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)

La prueba de difusión en agar se utilizó para determinar el efecto antimicrobiano de las películas sobre los microorganismos estudiados a través de la liberación del antimicrobiano desde la película hacia el sistema modelo. Para la realización del ensayo se plaquearon 15 mL de agar nutritivo PCA y se lo dejó solidificar. Se colocaron 100 μ L del inóculo mixto y se extendieron sobre la superficie del medio.

Posteriormente, se cortaron de manera aséptica discos de cada una de las películas estudiadas (7 mm de diámetro) y se colocaron sobre las placas previamente inoculadas. Las placas se pre-incubaron a 4 °C durante 48 horas y luego se incubaron a 28 °C por 24 h (Hanušová y col., 2010). La actividad inhibitoria se cuantificó midiendo el diámetro total del halo (diámetro película más zona de no crecimiento). Dado que se utilizó un cultivo mixto, se forman dos halos alrededor de las películas correspondientes a cada uno de los microorganismos. Esto se ha demostrado en estudios previos donde se evaluó la inhibición de los microorganismos con césped de cultivos simples en agar selectivo correspondiente (YGC para hongos y levaduras, TSYE_c para *Listeria innocua*) y luego se comparó con cultivos mixtos y agar nutritivo (PCA). Asimismo, se tomaron muestras con ansas de cada halo generado y se realizaron las pruebas bioquímicas de caracterización correspondientes para asegurar cuál halo de inhibición se relacionaba con el microorganismo dado (Ollé Resa y col., 2014). Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos corridas experimentales independientes.

2.9.2 Barrera a la contaminación de cultivos mixtos

Esta prueba denominada de barrera permite evaluar la capacidad de la película para evitar el paso de la contaminación externa través de la película y adicionalmente la capacidad de reducir las células viables que no pasan hacia el sistema modelo o alimento, pero quedan sobre la superficie de la película.

a) *en medio sólido*: la película se analizó sobre un alimento modelo semisólido (agar PCA). Se aplicó el ensayo realizado por Ollé Resa y col. (2014). Brevemente, se cortaron discos de 1 cm de diámetro de los siguientes sistemas: polímero sintético Cryovac® (Cry, utilizada como control referido al envasado que se utiliza habitualmente en la industria), películas comestibles con salvado de arroz procesado (S2) y películas con salvado de arroz procesado, natamicina y nisina (S2NANI) y se colocaron sobre la superficie del medio sólido. Luego, se dispensaron sobre las películas 10 µl de cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*. Las muestras se incubaron a 12 ± 1 °C (temperatura de abuso) durante 168 h y se tomaron muestras periódicamente para testear la viabilidad de los microorganismos. Cada película se retiró y se homogeneizó en agua con peptona (1:10) en un equipo Stomaker por 90 segundos (Bag Mixer - Interscience). Se realizaron sucesivas diluciones decimales y se determinó el crecimiento de microorganismos mediante el método de gota contando las unidades formadoras de colonias (UFC) en 20 µl de la dilución adecuada. La población celular se expresó como log (UFC / mL). Adicionalmente, las placas con el medio semisólido se incubaron a 37 °C durante 2 días sin las películas para observar su acción de barrera. La ausencia de colonias de microorganismos en el agar después de la incubación indica una buena acción de barrera. Se utilizaron dos unidades experimentales en cada tiempo de muestreo para cada tratamiento.

b) *sobre queso Port Salut argentino*: se aplicó el ensayo realizado por Ollé Resa y col. (2016). Brevemente, se cortaron trozos de películas de 2,5 x 2,5 cm (Cry, S2 y S2NANI) y se pusieron en contacto con la superficie del queso (2,5 x 2,5 x 1,2 cm). Luego, se dispensaron 10 µl de cultivo mixto sobre las películas. Las muestras se incubaron a 12 ± 1 °C (temperatura de abuso) durante 216 h y se tomaron muestras periódicamente para testear la viabilidad del microorganismo. Por un lado, se analizó cada película extraída de cada queso para determinar su acción frente a los microorganismos inoculados. Por otro lado, las muestras de queso sin películas se homogeneizaron en agua peptona (1:10) en un equipo Stomaker por 90 segundos y se

determinó la población microbiana por duplicado para evaluar la propiedad de barrera de las películas. El procedimiento utilizado para determinar el recuento microbiano fue el mencionado en la **sección 2.9.2.a** del presente capítulo.

2.9.3 Difusión de los antimicrobianos en queso Port Salud

El ensayo se preparó con el mismo procedimiento que la prueba de barrera, pero se dispensaron los 10 µl de cultivo mixto en la superficie del queso antes de colocar las diferentes películas. En este caso, se analizó el recuento microbiano del sistema completo, es decir el queso junto con la película para evitar retirar el inóculo que puede haber quedado adherido a la película. El procedimiento utilizado para determinar el recuento microbiano fue el mencionado en la **sección 2.9.2.a**

2.9.4 Actividad de barrera antimicrobiana de los recubrimientos sobre queso Port Salud

Este ensayo permite probar la capacidad de controlar y reducir la carga microbiana depositada en el recubrimiento constituido directamente sobre el queso Port Salut. Las muestras de queso se sumergieron en las suspensiones S2NANI_c, S2NANI_{2c} y S2NANI_{3c} y se constituyeron según la **sección 2.6**. Luego, se dispensaron 10 µl de cultivo mixto sobre la superficie. Las muestras se incubaron a 12 ± 1 °C durante 216 h y se tomaron muestras periódicamente para probar la viabilidad de los microorganismos. En este caso, el sistema completo (queso recubierto) se analizó para el recuento microbiano. Adicionalmente, a fines comparativos, se analizó un queso cubierto con el film SNANI_f. El procedimiento utilizado para determinar el recuento microbiano fue el mencionado en la **sección 2.9.2.a** del presente Capítulo.

2.10 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través del análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de probabilidad, $\alpha = 0,05$, y se aplicó el post test de Tukey. Los resultados se presentan como la media y la desviación estándar (Sokal y Rohlf, 2000). Se utilizaron los softwares GraphPad Prism®, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc., California) e InfoStat versión 2020 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) para el tratamiento y análisis de los datos.

3 Resultados y discusión

3.1 Evaluación fisicoquímica del salvado de arroz

3.1.1 Análisis proximal

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis proximal del PRB (**Tabla 2.2**), la fibra dietaria insoluble fue el principal componente observado. A partir de los datos de composición del salvado de arroz informados en la bibliografía, el contenido de fibra insoluble es de alrededor de 22-30% p/p (Kalpanadevi y col., 2018). Debido al proceso de preparación aplicado a esta materia prima en el presente trabajo, se podrían perder componentes solubles (azúcares, proteínas y almidón gelatinizado), obteniendo un producto con mayor contenido de fibra.

Tabla 2.2 – Análisis proximal del salvado de arroz procesado (PRB) y sin tratar en g/100 g salvado (base húmeda).

Componente	PRB	sin tratar*
humedad	6,50 ± 0,05 ^a	8,64 ± 0,04* ^b
ceniza	8,1 ± 0,2 ^a	8,46 ± 0,02* ^a
proteínas	7,7 ± 0,5 ^a	13,1 ± 0,4* ^b
Fibra	34,0 ± 0,6 ^b	31,50 ± 0,04 ^a
Lípidos	17,2 ± 0,3 ^a	17,2 ± 0,3* ^a
Carbohidratos	26 ± 2 ^b	21,1 ± 0,2 ^a

Los valores mostrados son un promedio (n=3) y su correspondiente desvío estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05) entre salvado de arroz procesado y sin tratar.

*Genevois y col. (2021).

3.1.2 Distribución de tamaño y morfología de las partículas de salvado de arroz procesado

La distribución de partículas de tamaño de PRB después del tamizado se muestra en la **Figura 2.5.a**. Se observó una distribución asimétrica donde los diámetros d(0,1), d(0,5) y d(0,9) fueron de 26 μm, 77 μm y 151 μm respectivamente. Los diferentes valores obtenidos para D [3,2] (46 μm) y D [4,3] (84 μm) indicaron heterogeneidad en los tamaños y formas de las partículas (Cano y col., 2014). Según el tamaño de la malla

utilizada para la separación del salvado, las partículas deben ser inferiores a 105 μm . Probablemente, podría ocurrir agregación o hinchamiento de partículas de salvado en medios acuosos y, por lo tanto, una pequeña fracción de partículas mostró valores de tamaño más altos por dispersión de luz estática. Adicionalmente, se determinó la frecuencia de partículas de diferentes tamaños. Los resultados indicaron que las partículas pequeñas ($<10 \mu\text{m}$) eran 89% en número, mientras que solo el 11% oscilaba entre 10-180 μm .

La morfología del PRB se puede ver en la **Figura 2.5.b**. Se detectaron formas irregulares con una alta proporción de partículas en forma de placa. La mayoría de las partículas tenían una longitud inferior a 20 μm que se correlacionaba bien con los resultados obtenidos por la dispersión de luz estática. El análisis de imagen (ImageJ 1.53a Wayne Rasband, EE. UU.) de las micrografías permitió estimar una relación de aspecto (l/e) de las partículas de salvado de 7.2.

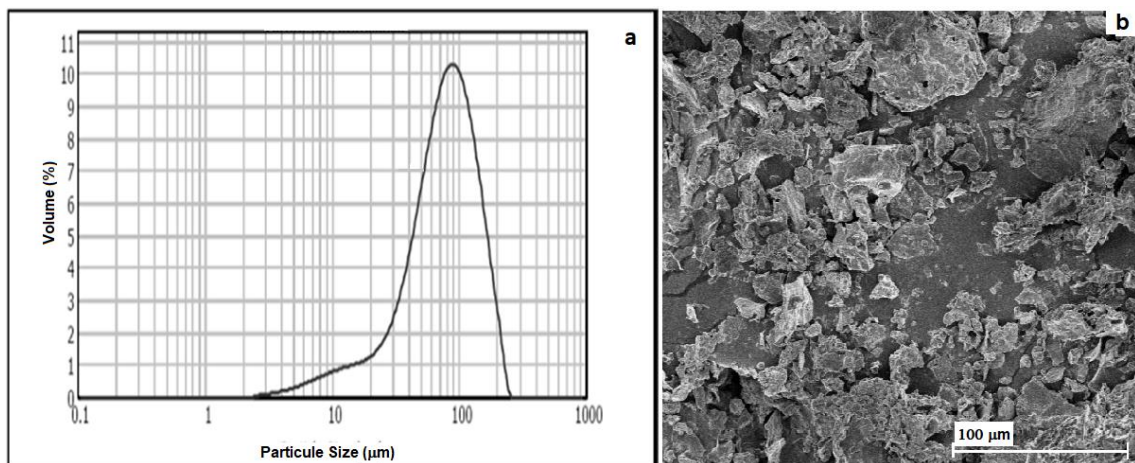


Figura 2.5- a) distribución del tamaño de partícula del salvado de arroz procesado obtenido por dispersión de luz estática y b) micrografía de salvado de arroz por microscopía electrónica de barrido (barra: 100 μm)

3.2 Caracterización fisicoquímica de películas

3.2.1 Propiedades mecánicas: ensayo de tracción

Se puede observar que la naturaleza de deformación de los polímeros a temperatura ambiente, bajo un esfuerzo aplicado, fue típica de plásticos dúctiles en términos de esfuerzo y deformación. Como ocurre generalmente con esos materiales, las películas exhibieron dos regiones características en cuanto a su comportamiento de deformación a la tracción. En deformaciones bajas (inferiores a 10%) el esfuerzo aumentó rápidamente

con un aumento en la deformación y las pendientes iniciales fueron elevadas en esta región, lo que indica un alto módulo elástico de los materiales. A deformaciones mayores a 10% las películas mostraron un menor incremento en el esfuerzo con el aumento de la deformación.

Las películas evaluadas resultaron flexibles, fáciles de manipular y con un espesor medio de $0,27 \pm 0,04$ mm ($n = 12$). Los resultados del esfuerzo a la tracción, el módulo de Young y la deformación a la ruptura se muestran en la **Figura 2.6**.

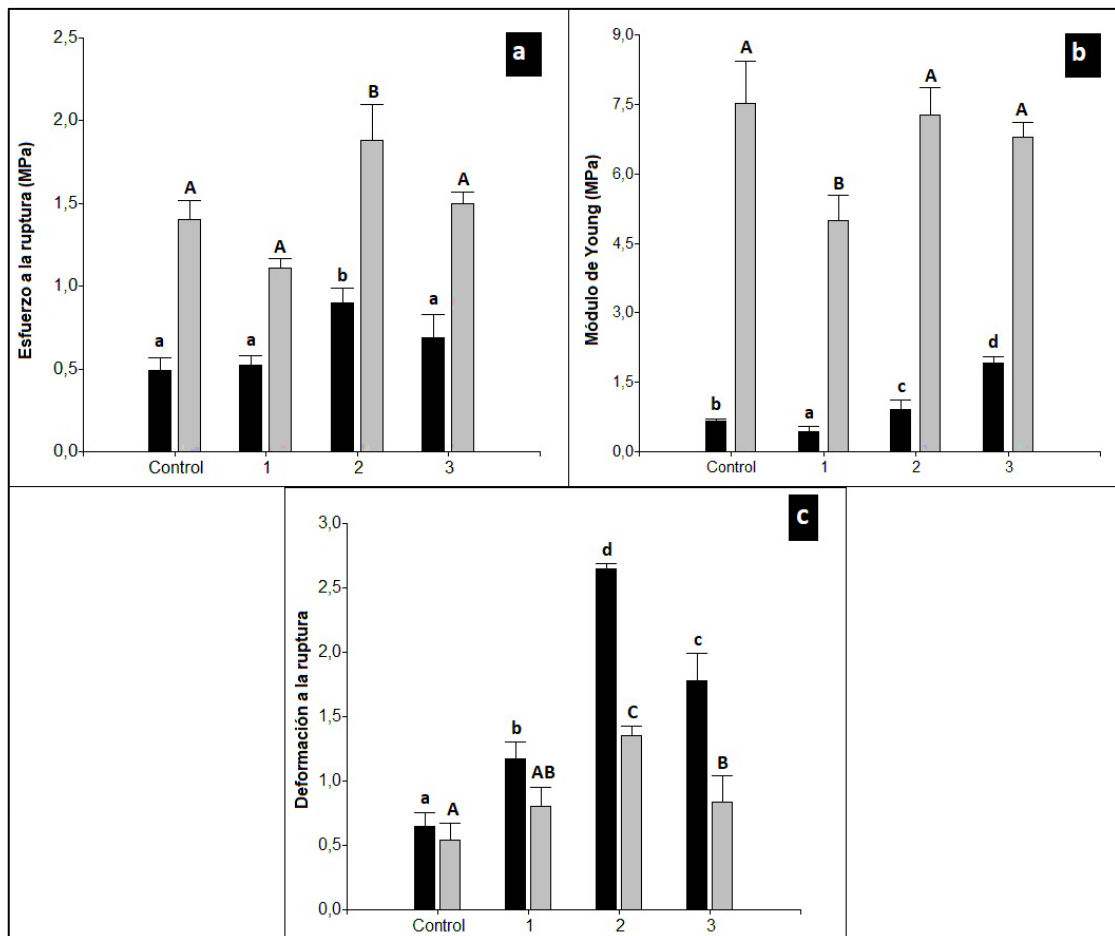


Figura 2.6- Propiedades mecánicas de las películas: esfuerzo a la ruptura (a) Módulo de Young (b) y deformación a la ruptura (c). Los números 1, 2 y 3 indican 0,1, 0,2 y 0,3 g de PRB 100 g^{-1} , respectivamente. Las barras negras y grises corresponden a películas con y sin antimicrobianos respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas entre películas ($p < 0.05$). Las letras minúsculas comparan los sistemas sin antimicrobianos. Las letras mayúsculas comparan los sistemas con antimicrobianos.

Se observó un aumento del esfuerzo a la tracción para S2 ($1,9 \pm 0,2$ MPa) en comparación con C, S1 y S3. Mientras que el módulo de Young fue mínimo para S1 pero no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para C, S2 y S3. En cuanto a la deformación a la ruptura, el valor más alto se obtuvo para S2 ($1,35 \pm 0,08$). Según Gutiérrez y Alvarez (2017), se puede establecer que los principales factores que modulan las propiedades de los compuestos fibra-almidón están relacionados con la fracción de volumen de fibra, dispersión, tamaño, forma, orientación y adhesión fibra-matriz. Como se determinó previamente, la distribución del tamaño de partícula de PRB mostró una proporción mayor de partículas pequeñas ($<10 \mu\text{m}$). Tal fracción probablemente resultó completamente cubierta por la matriz y bien separada de otras partículas, por lo tanto, la tensión podría transferirse de manera más efectiva a todo el sistema. Por el contrario, las partículas grandes ($10\text{-}180 \mu\text{m}$) difícilmente podrían permanecer aisladas a medida que aumenta la concentración de salvado. De acuerdo con los resultados del esfuerzo a la ruptura, se obtuvo la mayor eficiencia del relleno para S2, lo que indica una adhesión más efectiva y una distribución uniforme de la tensión. Por debajo del 0,2%, la cantidad de fibra incorporada no fue suficiente para modificar significativamente el esfuerzo a la ruptura. Por otro lado, la matriz no pudo soportar adecuadamente las partículas de salvado en las películas S3, especialmente las grandes, promoviendo una deficiente distribución y favoreciendo la floculación del relleno que redujo la capacidad de refuerzo del PRB. Kaewtatip y Thongmee (2012) informaron que comúnmente se observa un efecto de refuerzo neto de la fibra hasta un máximo para una dada cantidad de relleno. Posteriormente, la tendencia del relleno a aglomerarse o atravesar la matriz, determina el debilitamiento de la estructura de la película. Kargarzadeh y col. (2017) informaron efectos similares con la incorporación de diferentes cantidades de nanocristales de celulosa de fibra de cáscara de arroz a la matriz de almidón. Los biocompuestos de almidón con 6% en base seca de nanocristales de celulosa mostraron el mayor esfuerzo a la tracción con una mejora del 52%, mientras que la adición de un porcentaje mayor, 8 y 10%, presentó valores más bajos. De la misma manera, observaron que la deformación y el módulo de Young eran máximos con la adición del 6% y luego disminuyeron con 8 y 10% de nanocristales.

Adicionalmente, el valor de la relación de aspecto, $\left(\frac{l}{e}\right)_c$, se esperaba en el rango de 14-97 de acuerdo con los valores estimados de σ_{fu} , y σ_m , y se obtuvo un valor experimental de aproximadamente 7.2 para el PRB incorporado en las películas. Es

decir, no se alcanzó el esfuerzo máximo por adición del relleno para los sistemas estudiados y, en consecuencia, la capacidad de refuerzo no se aprovechó completamente. Probablemente, en la película S2, la mayor cantidad de relleno podría haber compensado, en parte, la baja relación de aspecto obtenida para PRB.

Por otro lado, cuando se agregó NANI a la formulación de la película, el esfuerzo a la ruptura y el módulo de Young disminuyeron en todos los sistemas, lo que podría atribuirse al efecto plastificante de los antimicrobianos sobre la matriz de almidón, como fuera informado anteriormente por Ollé Resa y col. (2014b). Asimismo, Shiroodi y col. (2016) mostraron reducciones significativas en las propiedades mecánicas de las películas a base de ácido poliláctico que contienen nisina en comparación con las películas de control sin antimicrobiano.

En la presente investigación, además del efecto producido por la presencia de NANI, también se observó que la incorporación de PRB produjo una tendencia de refuerzo en la matriz con antimicrobianos (**Figura 2.6.a y 2.6.b**).

En consecuencia, S2NANI_f mostró los parámetros de esfuerzo y de deformación a la ruptura más alto. En general, se observaron disminuciones del esfuerzo a la ruptura y del módulo de Young (55% y 85% respectivamente) para todos los sistemas con NANI en comparación con películas sin antimicrobianos. Por el contrario, la presencia combinada de NANI y PRB produjo un aumento significativo de la deformación en la ruptura (**Figura 2.6.c**). A diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación, Ge y col. (2017) informaron un aumento en el esfuerzo a la ruptura y el módulo de Young, pero una disminución en la deformación a la ruptura con un aumento en la concentración de montmorillonita (relleno) en películas comestibles a base de gelatina que contienen nisina. Esto posiblemente se relacione con el tipo de relleno incorporado, su composición y la relación de este con la matriz.

3.2.2 Evaluación del color

Los parámetros de color de las películas se muestran en la **Tabla 2.3**. Se pudo observar que el sistema control (C) tuvo los mayores valores de L^* y a^* pero los menores valores de b^* e YI, en comparación con S1, S2 y S3. Adicionalmente, las películas mostraron un aumento importante de b^* e YI y una reducción moderada pero significativa de L^* y a^* a medida que aumentaba la concentración de PRB, es decir, la adición del relleno oscureció la matriz de la película.

Cuando se agregó NANI a la matriz de almidón (CNANI), se observó un aumento significativo del color amarillo (b^* e YI) en relación con C. Adicionalmente, los sistemas con PRB y antimicrobianos (S1NANI_f, S2NANI_f y S3NANI_f) presentaron valores más altos de b^* , YI y a^* que las películas CNANI y sin PRB. Aparentemente, el propio color de PRB y NANI amarraron significativamente las películas, siendo tal efecto directamente proporcional a las concentraciones de fibra en las películas sin antimicrobianos. En consecuencia, se observó un aumento significativo en el valor de ΔE para cantidades mayores de PRB, principalmente debido al aumento de b^* . Robles-Flores y col. (2018) observaron valores de L^* cercanos a 55 en películas y recubrimientos comestibles obtenidos de la semilla de *Cajanus cajan* (aislado de proteína y goma) aplicada a fruta fresca de fresa, informando que la aplicación de recubrimiento comestible no afectó el aspecto de las fresas. Somboonsub y Thawornchinsombut (2015) también observaron una disminución de L^* (91.52 a 86.68) pero valores de a^* y b^* más altos (0.41 a 1.78 y 9.11 a 12.42, respectivamente), cuando se incorporó proteína de salvado de arroz de 0 a 30 g/g almidón en películas de almidón de yuca.

Tabla 2.3- Parámetros de color de las películas conteniendo diferentes concentraciones de PRB (S1, S2 y S3), conteniendo antimicrobianos y diferentes concentraciones de PRB (S1NANI_f, S2NANI_f y S3NANI_f) y películas control (C, CNANI).

sistemas	L*	a*	b*	YI	ΔE
C	88 ± 1 ^b	-1,18 ± 0,06 ^a	3,7 ± 0,3 ^a	6,7 ± 0,5 ^a	-
S1	86,8 ± 0,4 ^a	-1,39 ± 0,05 ^b	5,5 ± 0,5 ^b	10,4 ± 0,8 ^b	2,2 ± 0,2 ^a
S2	87,1 ± 0,7 ^a	-1,60 ± 0,02 ^c	6,9 ± 0,2 ^c	12,8 ± 0,7 ^c	3,4 ± 0,4 ^b
S3	86,5 ± 0,6 ^a	-1,62 ± 0,03 ^c	8,2 ± 0,6 ^d	15 ± 1 ^d	4,8 ± 0,2 ^c
CNANI	87,7 ± 0,5 ^B	-1,23 ± 0,09 ^A	9,74 ± 0,04 ^A	18,4 ± 0,5 ^A	-
S1NANI _f	86,3 ± 0,2 ^{AB}	-1,2 ± 0,2 ^{AB}	13,0 ± 0,6 ^B	23 ± 1 ^B	3,5 ± 0,4 ^A
S2NANI _f	86,1 ± 0,7 ^{AB}	-1,17 ± 0,06 ^B	12,9 ± 0,8 ^B	25 ± 2 ^B	3,5 ± 0,4 ^A
S3NANI _f	85,0 ± 0,2 ^A	-0,7 ± 0,1 ^B	15,1 ± 0,8 ^B	29 ± 2 ^B	6,0 ± 0,4 ^B

Se informa la media y el desvío estándar (n=4). Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas entre los sistemas sin antimicrobianos (p<0.05). Diferentes letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas entre sistemas con antimicrobianos (p<0.05).

3.2.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Los resultados de PVA se muestran en la **Tabla 2.4**. Se observó que películas con diferentes concentraciones de PRB y adicionadas o no con antimicrobianos no mostraron diferencias significativas en PVA siendo el valor medio $(1.6 \pm 0.2) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Considerando la matriz a base de almidón, la propiedad barrera de las películas estudiadas coincide con las reportadas por Flores y col. (2007) para almidón de mandioca: películas comestibles con glicerol, $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, y por Famá y col. (2009), $(5.5 \pm 0.1) \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, para películas a base de almidón plastificadas con glicerol y añadidas con 0,15 % p / p de salvado de trigo. Otros autores, (Bernhardt y col., 2017), al estudiar el efecto de un relleno en la matriz, observaron una disminución en la PVA cuando se agregó fibra de cáscara de mazorca de maíz a películas a base de pectina, reportando valores alrededor de $9 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para sistemas con 3-8 % p / p de fibra en comparación con el control sin relleno ($1 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}$

$^1\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$). Adicionalmente, Ollé Resa y col. (2014b) informaron que la incorporación de NANI en una matriz de almidón no modificó la PVA. Estos autores registraron una PVA de $(1.89 \pm 0.07) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ y $(1.03 \pm 0.07) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ para películas sin o con NANI, respectivamente. Aunque la adición de relleno a la matriz de la película supone una reducción de la tasa de transmisión de vapor debido a la mayor tortuosidad de la matriz, se deben considerar otros factores. Se estableció que la influencia de los rellenos en la permeabilidad de las películas de base biológica depende de la estructura del biopolímero, la concentración de relleno, el tipo y su compatibilidad con la red (Versino y García, 2014). Probablemente, en la presente investigación, el PRB incorporado a la formulación de las películas no fue suficiente para modificar significativamente la propiedad de barrera al vapor de agua.

Tabla 2.4- Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua de películas con diferentes concentraciones de salvado de arroz procesado (S1, S2 y S3), películas control (C) y películas con natamicina, nisina y diferentes concentraciones de salvado de arroz procesado (CNANI, S1NANI_f, S2NANI_f, S3NANI_f).

Sistemas	PVA × 10⁹ (g / Pa.m.s)	Solubilidad (%)
C	1,55 ± 0,27 ^a	34,6 ± 0,9 ^a
S1	1,43 ± 0,16 ^a	26 ± 2 ^b
S2	1,53 ± 0,15 ^a	25 ± 2 ^b
S3	1,70 ± 0,32 ^a	35 ± 2 ^a
CNANI	1,93 ± 0,77 ^A	40,0 ± 0,7 ^B
S1NANI_f	1,65 ± 0,13 ^A	41,6 ± 0,5 ^B
S2NANI_f	1,96 ± 0,21 ^A	37,8 ± 0,7 ^A
S3NANI_f	1,31 ± 0,33 ^A	42,32 ± 0,09 ^B

Se informa la media y el desvío estándar (n=2). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre sistemas (p<0.05)

3.2.4 Solubilidad en agua (WS)

Se puede observar en la **Tabla 2.4** que la adición de PRB en S1 y S2 disminuyó la SW de las películas alrededor de ~ 26 % con respecto a C. Una estructura de película más resistente al agua podría ser el resultado de una fuerte adhesión entre el relleno y la matriz de almidón. Sin embargo, el WS de S3 fue similar al control C. En este caso, tal nivel de PRB podría haber dificultado la formación de una red continua de almidón volviéndola más susceptible al agua como solvente. Edhirej y col. (2017) observaron efectos similares en relación con la adición de fibra de yuca / palma azucarera a los compuestos a base de almidón de yuca.

La presencia de antimicrobianos aumentó, en general, la solubilidad de las películas en agua. En un informe anterior, Ollé Resa y col. (2014b), observaron una acción plastificante de los conservantes (NANI) que redujeron las interacciones de las cadenas de biopolímeros en la matriz produciendo una película más soluble. En la presente investigación, si bien los antimicrobianos aumentaron la solubilidad, la presencia de PRB le otorgó una mayor resistencia a la matriz con valores de solubilidad menores en el sistema SNANI2, lo que indica una mejora en la resistencia al agua, tal vez debido a una mejor interacción y compatibilidad entre los componentes de la película.

3.2.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las películas C, S2, CNANI y S2NANI_f se muestran en la **Figura 2.7** donde se observaron las bandas típicas de la matriz de almidón, como componente principal de la formulación de la película. Es posible apreciar que la banda de 1650 cm⁻¹ (agua ligada) tenía diferente intensidad dependiendo de la muestra de película. Por lo tanto, se calculó la relación de absorbancia 1650 cm⁻¹/1455 cm⁻¹ (CH₂ torsión en el plano) para predecir el nivel de agua presente en la matriz de la película, mostrando que CNANI (0.899) > S2NANI_f (0.655) > C (0.362) > S2 (0,019). Aparentemente, las películas que contienen S2 excluyeron algunas moléculas de agua de la red de películas, posiblemente en la zona de interfase, debido a una buena compatibilidad entre PRB y almidón a través de grupos hidrófilos. Por el contrario, CNANI pareció desarrollar las principales interacciones agua-almidón, mientras que SNANI2 tendió a reemplazar algunas de ellas con enlaces PRB-matriz de almidón. Edhirej y col. (2017) informaron que la película de almidón de yuca mostró una señal intensa a 1658 cm⁻¹, pero esta banda disminuyó de manera gradual y proporcional a medida que aumentaba la cantidad de fibra de caña de azúcar. Las tendencias

observadas en la intensidad de la banda de 1650 cm^{-1} en la presente investigación, se pueden relacionar con el contenido de humedad de las películas: 30.3 ± 0.1 , 34.39 ± 0.05 , 15.7 ± 0.2 y $13.5 \pm 0.3\text{ g} / 100\text{ g b.s.}$ para CNANI, S2NANI_f, C y S2, respectivamente. Efectivamente, la película S2 mostró el valor de humedad más bajo ($p < 0.05$) mientras que la presencia de NANI podría promover el establecimiento de más capas de agua absorbida, posiblemente debido a su efecto plastificante que imparte un carácter hidrófilo más alto a tales películas como se explicó anteriormente en los resultados de solubilidad en agua (**sección 3.2.4**). Los niveles de humedad de los sistemas y el conocido efecto plastificante del agua podrían explicar parcialmente el aumento de la deformación a la ruptura de S2NANI_f en relación con la película S2 y de CNANI en relación con C (**Figura 2.6.c**).

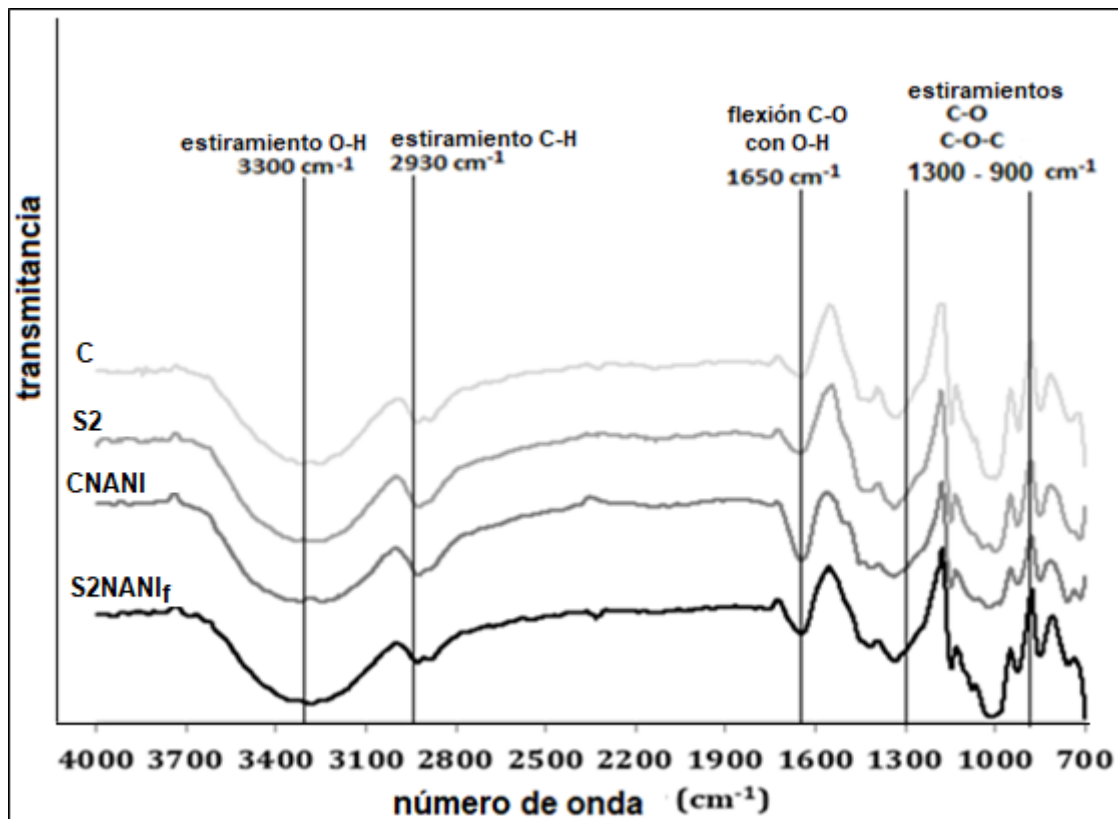


Figura 2.7- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de películas a base de almidón: control (C), con 0,2 g de salvado de arroz procesado (S2), con natamicina y nisina (CNANI) y con 0,2 g de salvado de arroz procesado, natamicina y nisina (S2NANI_f).

Asimismo, varios autores (Monroy y col., 2018; Wang y col., 2015) han informado los cocientes de absorbancia de $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ y $1022\text{ cm}^{-1}/995\text{ cm}^{-1}$ como indicadores de la relación de las estructuras ordenadas/amorfas y amorfas/hidratadas en

la matriz de almidón en las películas, respectivamente. Al aumentar la organización de la estructura del almidón, la primera relación mencionada aumenta mientras que la segunda disminuye (Ambigaipalan y col., 2013; Monroy y col. 2018). Los cocientes calculados de $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ fueron $S2 (1.098) > C (0.627) > S2NANI_f (0.595) > CNANI (0.444)$ mientras que las proporciones de $1022\text{ cm}^{-1}/995\text{ cm}^{-1}$ fueron $CNANI (1.936) > S2NANI_f (1.068) > C (1.007) > S2 (0.675)$ sugiriendo que la película S2 presentaba una estructura más organizada mientras que la presencia de los antimicrobianos, por el contrario, aumentaba el carácter amorfo. La acción plastificante de los conservantes naturales puede explicar el valor de las relaciones $1022\text{ cm}^{-1}/995\text{ cm}^{-1}$ en $S2NANI_f$ y $CNANI$. Se informó que un aumento en la fase cristalina de un material biopolimérico semicristalino está altamente relacionado con la disminución de su contenido de humedad (Famá y col. 2009). Tal tendencia podría haber contribuido a la reducción observada en el contenido de humedad de las películas S2 y C en comparación con las películas antimicrobianas. Adicionalmente, el aumento de estructuras organizadas en una matriz de almidón plastificado cuando se agrega una fibra celulósica se ha relacionado con una capacidad facilitada de las cadenas de amilopectina para cristalizar en la zona de interfase relleno-almidón (Angle's y Dufresne, 2000). Probablemente, tal condición podría haber colaborado en el desarrollo de una respuesta de esfuerzo a la ruptura más alta de las películas S2 en comparación con las películas C, $CNANI$ y $S2NANI_f$ (**Figura 2.6.a**).

3.2.6 Microestructura: microscopía óptica y SEM

Las imágenes observadas bajo el microscopio óptico mostraron una matriz homogénea y continua para las películas C (**Figura 2.8.a**), mientras que se pudieron observar formas variables y una distribución uniforme de PRB en una matriz clara para S1 y S2 (**Figuras 2.8.b y 2.8.c**). Cuando se utilizó una mayor cantidad de PRB (S3, **Figura 2.8.d**), la densidad de partículas aumentó, oscureciendo la matriz de acuerdo con los resultados de color (**Tabla 2.3**). Según Ludueña y col. (2012), el aumento de la densidad de relleno en matriz podría promover la constitución de agregados. La presencia de estos grupos no permite una correcta interacción matriz-relleno y, por lo tanto, se obtiene una adhesión interfacial polímero-relleno más débil de lo esperado. Considerando dicho fenómeno, se podrían explicar los resultados WS y mecánicos observados para S3.

A su vez, se utilizó SEM para examinar cualitativamente la microestructura y la adhesión interfacial de la matriz de almidón y PRB. Las películas C mostraron una superficie homogénea (**Figura 2.8.e**) mientras que CNANI exhibió una estructura entramada y continua (**Figura 2.8.g**). Ambas películas presentaron un ensamblaje compacto (**Figuras 2.8.i y 2.8.k**) y se observaron algunos fragmentos de natamicina incorporados uniformemente en la matriz en CNANI.

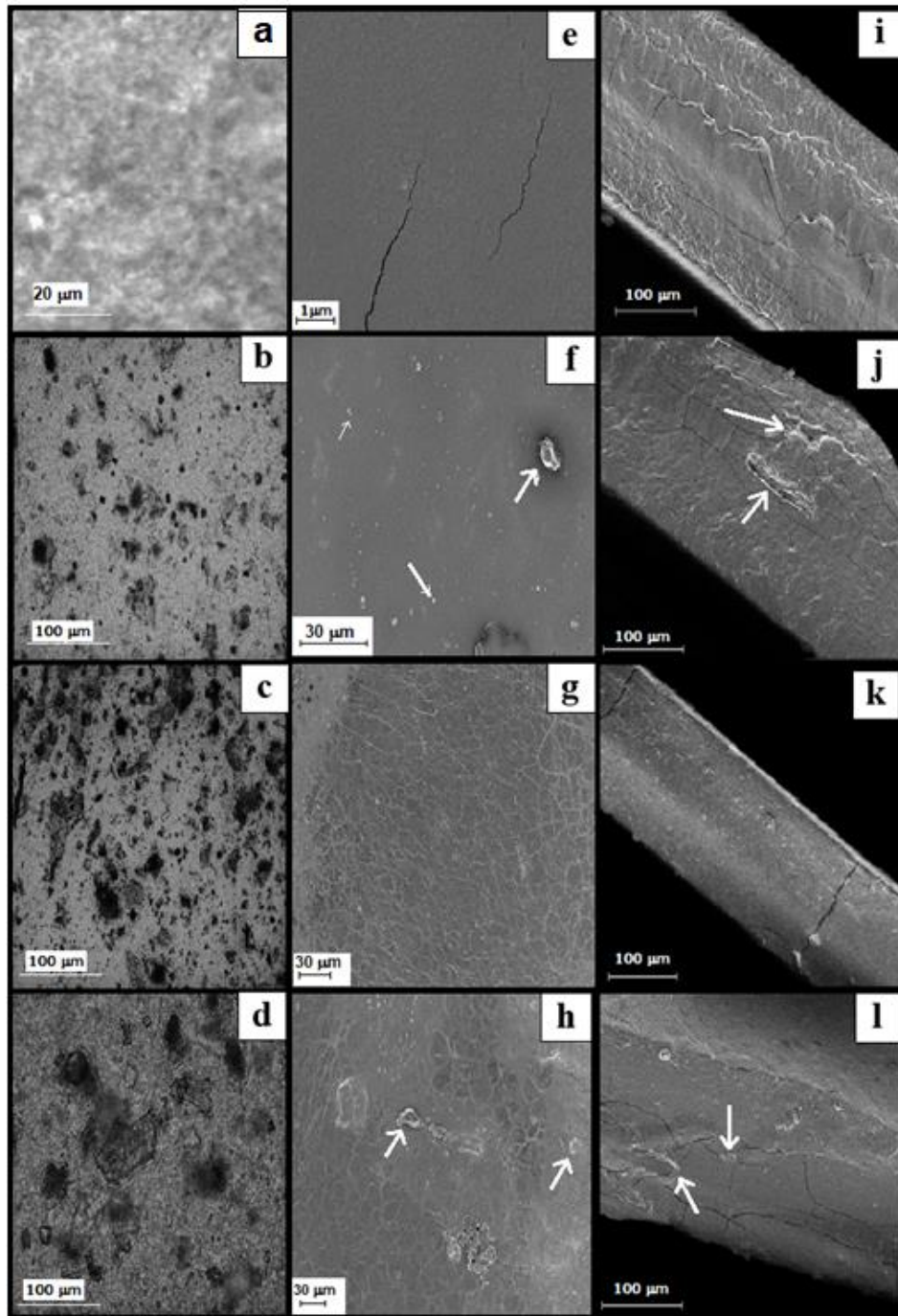


Figura 2.8- Microscopía óptica de C (película control) (a) y películas con 0.1 g (b), 0.2 g (c) y 0.3 g (d) de salvado de arroz procesado en 100 g de slurry. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de superficies de las películas C (e), S2 (f), CNANI (g) y S2NANI_f (h). Imágenes SEM de las fracturas de C (i), S2 (j), CNANI (k) y S2NANI_f (l). Las flechas indican partículas de PRB en la matriz.

La adición del relleno en S2 y S2NANI_f (**Figuras 2.8.f y 2.8.h**) condujo a la formación de superficies más heterogéneas con algunas partículas de relleno expuestas en la superficie (señaladas con flechas en las **Figuras 2.8.f y 2.8.h**).

Las micrografías de la superficie de fractura de S2 y S2NANI_f (**Figuras 2.8.j y 2.8.l**) revelaron que el PRB estaba ajustadamente inmerso en una matriz de almidón densa, incorporándose estructuralmente en la red. Además, no se observaron huecos o espacios vacíos alrededor de la interfaz PRB-matriz, lo que sugiere una fuerte interacción entre ambos componentes. Kuciel y Liber-Knec (2009) informaron que los rellenos naturales y las redes de almidón podrían tener una alta compatibilidad química y una buena adhesión en la zona interfacial debido a su carácter hidrófilo. A su vez, otros autores han informado comportamientos similares para compuestos a base de almidón utilizando diferentes rellenos (Edhirej y col., 2017 con fibra de yuca/azúcar de palma; Fu y col., 2017 con fibra dietaria de okara y Kargarzadeh y col., 2017 con fibra de cáscara de arroz). Adicionalmente, se observó una estructura de red más integrada en la película S2NANI_f que en S2, lo que sugiere una mejora en la compatibilidad de los componentes de la película cuando NANI estaba presente.

3.3 Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos

Para continuar con los estudios de las películas desarrolladas, se seleccionaron S2 y S2NANI_f en función de sus mejores propiedades mecánicas y solubilidad en agua. A su vez, al solo efecto de comparación, se analizaron los sistemas control C y CNANI.

3.3.1 Difusión en medio semisólido (Ensayo del halo)

Los resultados de la prueba de difusión realizada en medio semisólido para S2, CNANI y S2NANI_f se muestran en la **Figuras 2.9.a, 2.9.b y 2.9.c** respectivamente. La película con PRB y sin antimicrobiano (S2) no generó halos, demostrando que esta película no presentaba propiedades antimicrobianas (**Figura 2.9.a**). Por otro lado, en los sistemas con antimicrobianos (CNANI y S2NANI_f) se observaron dos zonas de inhibición superpuestas. Un halo de menor diámetro que corresponde a la zona de inhibición de *L. innocua* por acción de nisina, y un halo de mayor diámetro que corresponde a la zona de inhibición de *S. cerevisiae* por acción de natamicina. Los diámetros de los halos fueron CNANI: $2,5 \pm 0,1$ cm y S2NANI_f: $2,1 \pm 0,1$ cm para la natamicina; CNANI: $2,1 \pm 0,1$ cm y S2NANI_f: $1,7 \pm 0,1$ cm para nisina. Aunque se observó un halo significativamente menor ($p < 0.05$) para *L. innocua* en S2NANI_f que

para CNANI, se verificó que el PRB incorporado (**Figura 2.9.c**) no impidió la difusión de NANI, permitiendo la formación de halos de inhibición para levadura y bacterias con eficacia.



Figura 2.9- Resultados de la prueba de difusión de películas: con 0,2 g de salvado de arroz elaborado 100 g^{-1} suspensión (a), con natamicina y nisina (b) y con 0,2 g de salvado de arroz elaborado, natamicina y nisina (c), contra cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*.

Ollé Resa y col. (2014) observaron dobles halos similares en película a base de almidón con natamicina y nisina y verificaron que el halo de menor diámetro correspondía a la inhibición del crecimiento de *L. innocua* y *S. cerevisiae* y el de mayor diámetro a la de *S. cerevisiae*. Adicionalmente, Pintado y col. (2010) observaron la formación de halos de tamaño similar en películas de proteína de suero que contenían ácido málico, nisina y natamicina. Los halos que se presentaron correspondieron a microorganismos deteriorativos: *Yarrowia lipolytica* y *Penicillium roquefortii* y a microorganismos patógenos: *L. monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, aislados de la superficie del queso.

3.3.2 Actividad de barrera de las películas

a) Barrera a la contaminación de un cultivo mixto en medio semisólido

Para probar la eficacia como barrera, cada película inoculada con un cultivo mixto (*S. cerevisiae* y *L. innocua*) se retiró de la superficie del agar y las placas que contenían PCA se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Después de la incubación, se observó que no hubo crecimiento en la superficie del sistema modelo debajo de las películas, lo que indica que todas las películas evaluadas son efectivas como barrera.

La capacidad de las películas para disminuir la población de *L. innocua* en un cultivo mixto inoculado sobre la superficie de las películas almacenadas a $12 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ se muestra en la **Figura 2.10.a**. Las películas mostraron un recuento bacteriano inicial de 8 log

(UFC / mL) correspondiente al cultivo inoculado. La película comercial (Cry) presentó una disminución de dos ciclos logarítmicos hasta las 48 h, luego de lo cual la población de bacterias se mantuvo alrededor de 6 log (UFC / mL) durante todo el almacenamiento. Las películas de S2 (sin conservantes) permitieron el crecimiento de las bacterias en un ciclo logarítmico. Por el contrario, las películas antimicrobianas (S2NANI_f) tuvieron un efecto bactericida durante todo el ensayo. A su vez, se observó que después de 48 h los recuentos de *L. innocua* permanecieron por debajo del límite de detección (<2 log (UFC/mL)).

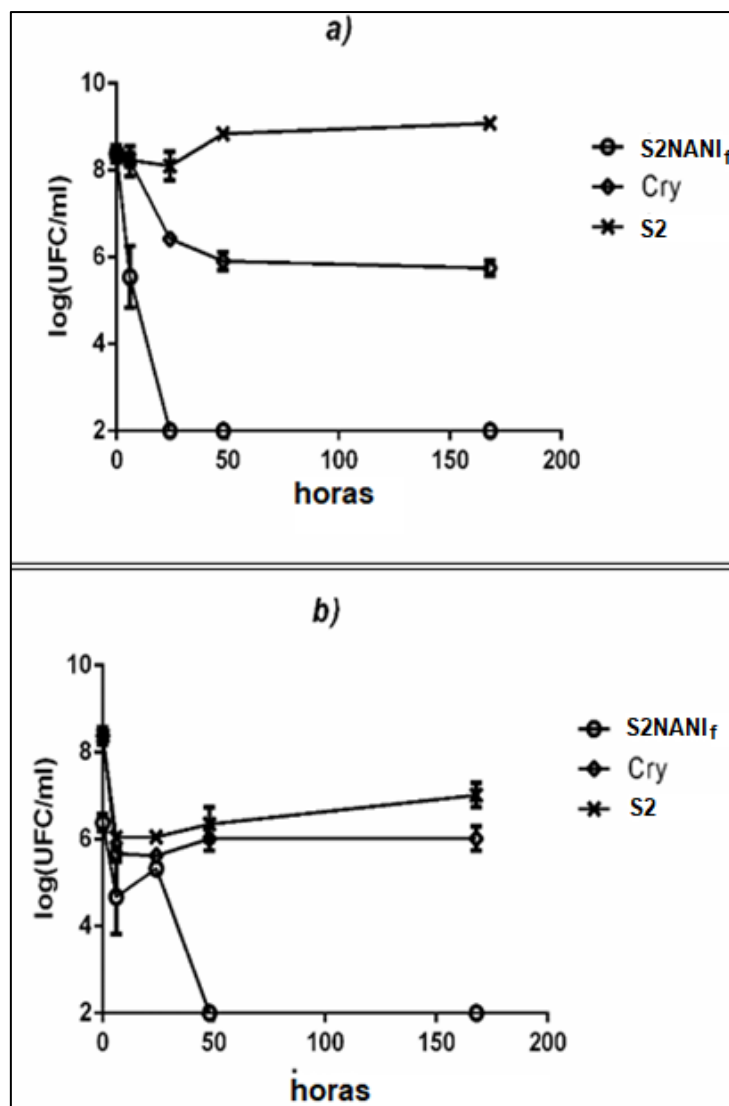


Figura 2.10- Actividad de barrera de películas inoculadas con cultivo mixto apoyadas sobre un medio sólido y almacenadas a 12 °C. Película sin antimicrobianos (S2), película con natamicina y nisina (S2NANI_f) y película comercial (Cry). Panel a: *Listeria innocua*. Panel b: *Saccharomyces cerevisiae*.

La **Figura 2.10.b** muestra el efecto de las películas sobre la supervivencia de *S. cerevisiae*. Al igual que en el caso de la bacteria, Cry y S2 no tuvieron acción antimicrobiana frente a una contaminación externa por levadura y mostraron una población de 6 y 7 log (UFC / mL) a lo largo del almacenamiento respectivamente. Por otro lado, la película SNANI_f mostró un recuento de levaduras significativamente menor ($p < 0.05$) que las películas Cry y S2. En este caso, disminuyeron su recuento hasta llegar a las 48 h por debajo del límite de detección y permanecer de esta forma hasta el final del almacenamiento, poniendo en evidencia su efecto fungicida.

Estos resultados permitieron verificar que los antimicrobianos presentes en el S2NANI_f estaban disponibles y podían actuar eficazmente contra los microorganismos inoculados. Por tanto, estas películas podrían utilizarse como barrera antimicrobiana.

Otros autores han informado previamente la capacidad de las películas basadas en diferentes polisacáridos y conteniendo natamicina y / o nisina para actuar como barrera a la contaminación. Costa y col. (2018) observaron que la incorporación de antimicrobianos (nisina, natamicina, aceites esenciales, lisozima) en la matriz de recubrimiento a base de almidón resultó en una reducción del deterioro, al considerar la contaminación post-proceso sobre el recubrimiento, ya que los mismos tuvieron la capacidad de mantener altas concentraciones de la sustancia activa en la matriz evitando su migración y prolongando la vida útil. Asimismo, Hager y col. (2019) informaron que la nisina contenida en un recubrimiento comestible (solución de película de 90.000 UI / 15 mL) a base de zeína de maíz, mostró ser una bacteriocina eficaz contra *Listeria monocytogenes* inoculada en la superficie de un filete de pescado cubierto presentando un recuento superior a 7 log en los sistemas sin antimicrobianos frente a 1 log en el sistema con nisina en el quinto día de almacenamiento. Yangılar y Oğuzhan (2015), evaluaron la eficiencia de las películas comestibles de caseína / natamicina para controlar el crecimiento de moho durante la maduración del queso Kashar. Concluyeron que los recuentos más altos de moho se encontraban en el sistema de control (2,87 log (UFC / g)), mientras que los más bajos estaban en el sistema caseína / natamicina (<1 log (UFC / g)) a los 90 días de maduración.

b) Barrera a la contaminación de cultivos mixtos en queso Port Salut

El desarrollo de la contaminación en el queso cubierto con diferentes películas y el queso sin recubrir se muestra en la **Figura 2.11**.

El queso sin recubrir permitió el crecimiento de *L. innocua* y *S. cerevisiae* sin restricciones, comenzando con un recuento de 5 log (UFC / mL) y llegando al final del almacenamiento con 6 y 7 log (UFC / mL) para bacterias y levaduras, respectivamente. Mientras que los quesos previamente cubiertos con películas S2NANI_f, Cry y S2 tuvieron recuentos por debajo del límite de detección durante el almacenamiento (los valores difieren significativamente respecto a los valores del queso sin recubrir, $p < 0.05$). Por tanto, estas películas demostraron evitar el paso de *L. innocua* y *S. cerevisiae* a la superficie del queso.

Por otro lado, el comportamiento antimicrobiano de las películas durante el mismo período se muestra en la **Figura 2.12**. Las películas S2 y Cry mantienen el nivel de contaminación inicial durante el almacenamiento y por lo tanto no muestran actividad antimicrobiana contra *L. innocua* (**Figura 2.12.a**). Por el contrario, la película S2NANI_f mostró una reducción progresiva hasta 3 ciclos logarítmicos al final del almacenamiento mostrando su efectividad contra la contaminación post-proceso de *L. innocua* (los valores difieren significativamente de los otros sistemas al final del almacenamiento, $p < 0.05$). En este sentido, el queso Port Salut recubierto con esta película será un producto más seguro en relación con el queso sin recubrir y el queso con las películas Cry y S2.

La **Figura 2.12.b** muestra la supervivencia de *S. cerevisiae* inoculado en diferentes películas, durante el almacenamiento. En el caso de las películas S2 y Cry, se observó un aumento en el recuento de 5 y 7 log (UFC / mL). Nuevamente, la película que contiene antimicrobianos (S2NANI_f) fue eficaz contra la levadura, reduciendo su crecimiento y alcanzando valores por debajo del límite de detección desde las 24 h hasta los 9 días de almacenamiento a 12 °C (valores difieren significativamente de los demás, $p < 0,05$).

Es importante resaltar que los resultados obtenidos utilizando el queso como alimento real fueron consistentes con los obtenidos con el sistema de alimento modelo (**Figura 2.10 y Figura 2.12**).

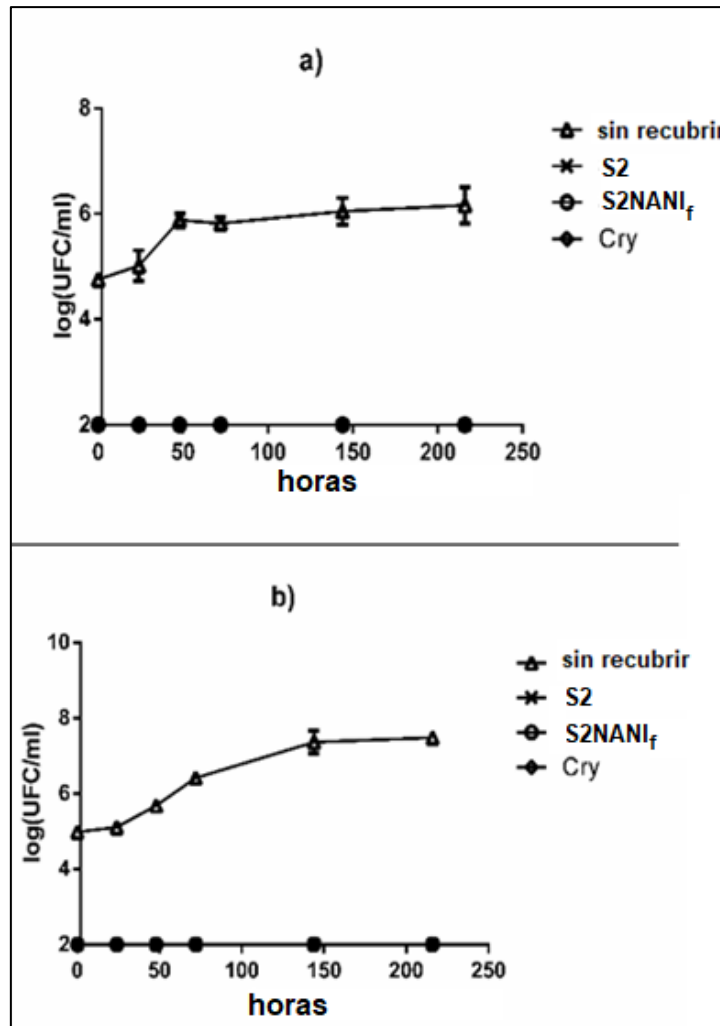


Figura 2.11- Análisis de Barrera a la contaminación con inóculo de cultivo mixto sobre queso Port Salut a 12 °C durante el almacenamiento. Análisis microbiológico de quesos. Las muestras de queso se cubrieron previamente con: película sin antimicrobianos (S2), película con natamicina y nisina (S2NANI_f), película comercial (Cry). Queso inoculado y sin película (sin recubrir). Panel a: *Listeria innocua*. Panel b: *Saccharomyces cerevisiae*.

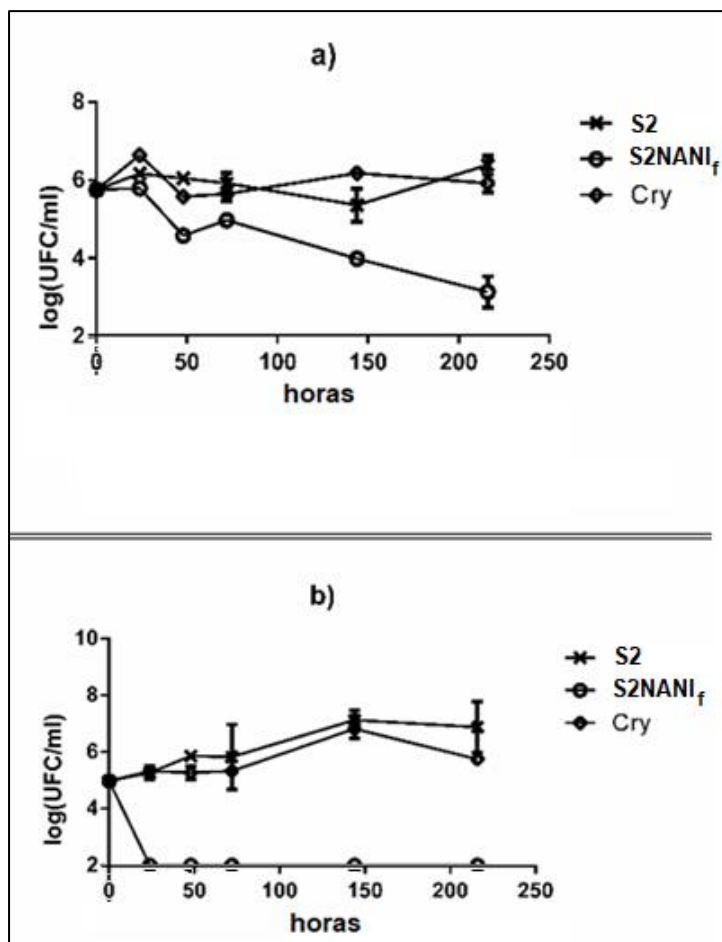


Figura 2.12- Análisis de Barrera a la contaminación con inóculo de cultivo mixto sobre queso Port Salut a 12 °C durante el almacenamiento. Análisis microbiológico de las películas que recubren el queso. Película sin antimicrobianos (S2), película que contiene salvado de arroz, natamicina y nisina (S2NANI_f), película comercial (Cry). Panel a: *Listeria innocua*. Panel b: *Saccharomyces cerevisiae*.

Según los resultados, tanto la película S2 como la Cry mostraron una buena capacidad de barrera ya que evitaron el traspaso de microorganismos desde la superficie de la película al queso. Sin embargo, no redujeron el recuento de microorganismos sobre las películas previamente inoculadas. Si bien la propiedad de impedir el paso de microorganismos desde el exterior del envase hacia el alimento es importante para su protección contra la contaminación externa, no es suficiente para garantizar la seguridad microbiológica del queso. Por el contrario, la película que contiene antimicrobianos (S2NANI_f) impidió el paso de la contaminación al alimento e inhibió el desarrollo del cultivo mixto permitiendo ofrecer un producto más seguro al consumidor.

Romero y col. (2016) estudiaron la acción de la natamicina en películas biodegradables obtenidas a partir de harina de triticale sobre quesos blandos y observaron que la película puede ser un eficiente envase antimicrobiano de alimentos contra mohos inoculados en superficie como contaminación post-proceso. Adicionalmente, Martins y col. (2010) estudiaron la acción de la nisina en películas a base de galactomananos en queso ricotta y observaron una disminución del crecimiento de *L. monocytogenes* en queso durante el almacenamiento a 4 °C.

3.3.3 Difusión de los antimicrobianos en queso Port Salut

En la **Figura 2.13** se presenta el desarrollo de *L. innocua* y *S. cerevisiae* presentes en un cultivo mixto inoculado en la superficie del queso que inmediatamente se cubrió con diferentes películas. Es importante resaltar que, en estos ensayos, el queso y la película fueron analizados juntos para el recuento microbiano. Las películas no se despegaron para evitar la pérdida de células viables. En los quesos no inoculados, los valores se mantuvieron por debajo del límite de detección durante toda la prueba, lo que indica que el queso no contenía los microorganismos involucrados en el estudio (datos no mostrados).

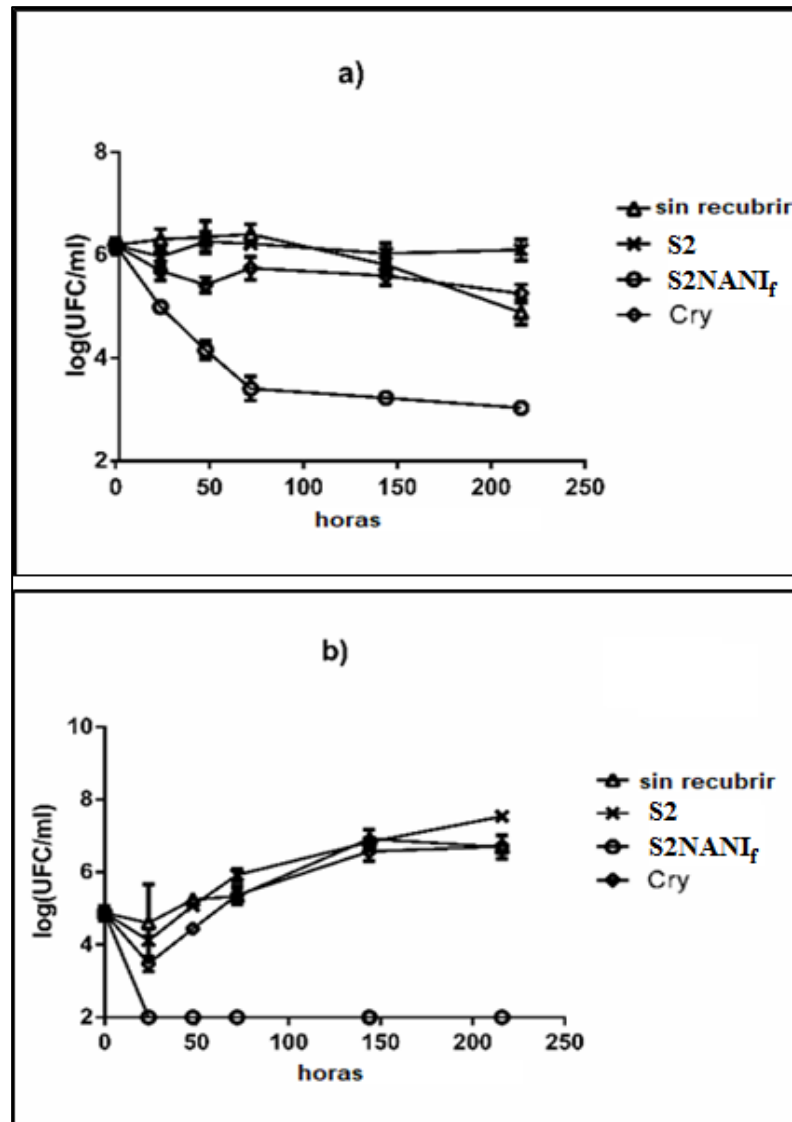


Figura 2.13- Ensayo de difusión en queso argentino Port Salut, almacenamiento a 12 °C. Las muestras de queso se cubrieron con: película sin antimicrobianos (S2), película con natamicina y nisina (S2NANI_f) y película comercial (Cry). Queso sin película inoculado (sin recubrir). Panel a: *Listeria innocua*. Panel b: *Saccharomyces cerevisiae*.

La **Figura 2.13.a** muestra un valor casi constante, a partir de un inóculo de 6 log (UFC / mL) de *L. innocua* durante el almacenamiento para quesos cubiertos con las películas S2, Cry y para el sistema sin recubrimiento. Por lo tanto, es posible decir que los quesos con estas películas y sin película no son seguros. Sin embargo, es importante señalar que los quesos cubiertos con S2NANI_f sí experimentaron una disminución significativa en el recuento de bacterias, mostrando una diferencia de 2 ciclos logarítmicos respecto a los quesos cubiertos con las otras películas y el queso sin

recubrir al final del ensayo (los valores difieren significativamente, $p < 0,05$). Por lo tanto, se puede afirmar que esta película pueda contribuir favorablemente a la conservación del queso. Meira y col. (2016) estudiaron el efecto antimicrobiano de bio-nanocompuestos, películas de almidón-halloysita con nisina obtenidas por extrusión, sobre la calidad microbiológica del queso Minas Frescal. El queso se inoculó primero en la superficie con *L. monocytogenes* y luego se cubrió con las películas. Observaron que después de 4 días y hasta 14 días, las películas con 6 g / 100 g de nisina inhibieron la bacteria por debajo del límite de detección del método.

La **Figura 2.13.b** presenta la respuesta de *S. cerevisiae* presente en quesos cubiertos con S2, Cry y sin recubrir donde se observa un aumento de 2 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento. Por el contrario, los quesos recubiertos con la película S2NANI_f mostraron una rápida disminución en el recuento de levaduras, alcanzando valores por debajo del límite de detección, permitiendo una mejor conservación del producto (valores difieren significativamente de los demás, $p < 0.05$). En este sentido, Yangilar y Oguzhan Yildiz (2016) estudiaron la acción de la natamicina contenida en películas comestibles a base de caseína sobre queso Kashar durante 90 días de almacenamiento. Observaron una reducción significativa del crecimiento de moho (< 1 log UFC / g) durante el proceso de maduración que extendió la vida útil del queso en comparación con el control (2,87 log UFC / g) sin efectos adversos sobre la calidad del queso. Adicionalmente, Yangilar (2017) obtuvo resultados similares cuando cubrió el queso Kashar con películas comestibles a base de caseína que contenían natamicina y aceites esenciales.

Estos resultados del análisis microbiológico demuestran que los antimicrobianos contenidos en S2NANI_f pueden difundir a la superficie del queso para inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de levaduras, actuando como un envase activo.

3.3.4 Actividad de barrera antimicrobiana de los recubrimientos en queso Port Salut

Con el fin de comparar la acción antimicrobiana de las películas comestibles frente al desempeño de los recubrimientos, se probaron los tres recubrimientos descritos en la **Tabla 2.1.b**. Dado que la suspensión adherida a la superficie del queso era significativamente menor que la masa de la película correspondiente, la cantidad final de antimicrobianos en contacto con el queso no fue similar. Como resultado de esta situación, el antimicrobiano presente en un recubrimiento que soportaba un contenido similar de antimicrobianos en la mezcla inicial (S2NANI_c) que la película de S2NANI_f,

no fue suficiente para inhibir los microorganismos presentes alcanzando un recuento de 7 ciclos log para *S. cerevisiae* y 6 ciclos log para *L. innocua*, presentando un comportamiento similar al sistema sin recubrir.

La **Figura 2.14.a** muestra que la película S2NANI_f y el recubrimiento S2NANI3_c sobre el queso Port Salut inhibieron en igual magnitud el desarrollo de *L. innocua* (los valores no difieren significativamente, $p > 0,05$). En ambos casos, los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección después de 72 h de almacenamiento.

Adicionalmente, el recubrimiento S2NANI2_c mantuvo recuentos alrededor de 5 log (UFC / mL), lo que sugiere que la concentración de antimicrobianos no fue suficiente para inhibir el desarrollo a niveles aceptables (los valores difieren significativamente, $p < 0,05$).

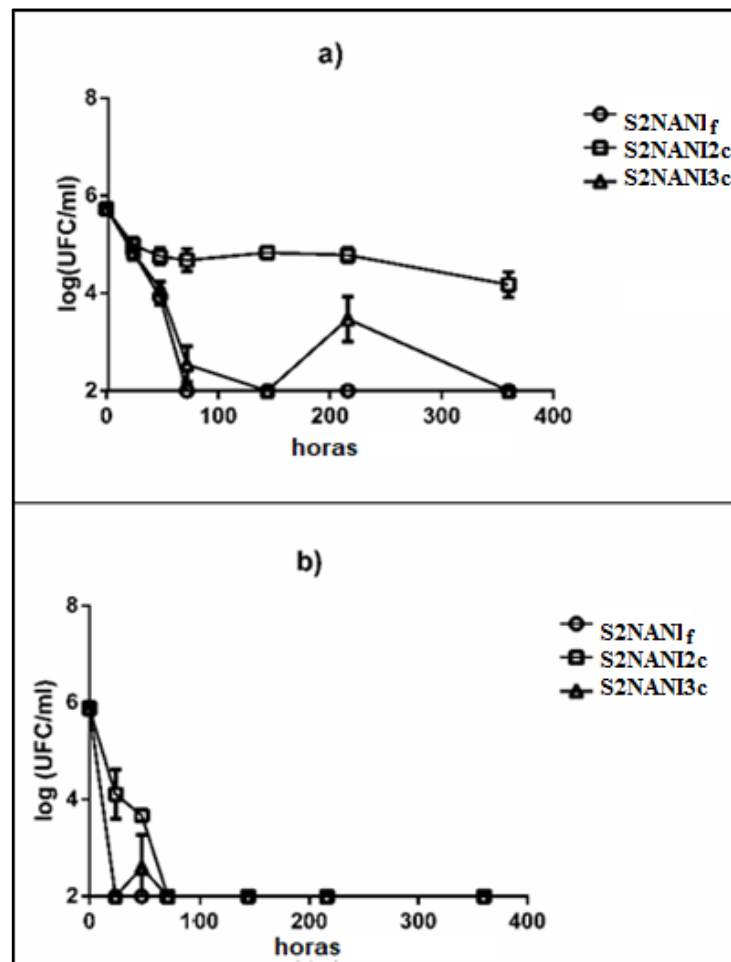


Figura 2.14- Actividad antimicrobiana de recubrimientos y película en queso Port Salut. Eficacia de los diferentes tratamientos aplicados en el almacenamiento de queso Port Salut a 12 °C. Película con natamicina y nisina (S2NANI_f) y recubrimientos con natamicina y nisina (S2NANI2_c y S2NANI3_c). Panel a: *Listeria innocua*. Panel b: *Saccharomyces cerevisiae*.

La **Figura 2.14.b** muestra que la película S2NANI_f y los recubrimientos S2NANI_{2c} y S2NANI_{3c} inhibieron de forma similar el desarrollo de *S. cerevisiae*. S2NANI_{3c} inhibió la levadura más rápido que S2NANI_{2c}. Después de 72 h de almacenamiento, los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección para todos los sistemas (sin observarse diferencias significativas entre ellos, $p > 0,05$).

Algunos autores han evaluado la actividad de la natamicina y la nisina contenidas conjuntamente en películas o recubrimientos a base de almidón frente a mohos y bacterias presentes en el queso y han observado una disminución en los recuentos de microorganismos debido a la liberación progresiva del antimicrobiano (Valdés y col., 2017). Berti y col. (2019) informaron que la natamicina y la nisina en niveles similares y contenidas en un recubrimiento comestible a base de almidón en el queso Gouda inhibieron el desarrollo de *S. cerevisiae* y *L. innocua* durante la maduración.

4 Conclusiones

En el presente capítulo, se muestran los resultados correspondientes al desarrollo y caracterización de películas comestibles a base de almidón de mandioca plastificadas con glicerol (2 g / 100 mL de slurry), como soporte de los antimicrobianos naturales natamicina y nisina (NANI) y reforzadas con salvado de arroz procesado (PRB).

En una primera etapa, se estableció la influencia de la presencia de PRB (en un rango entre 0,1 y 0,4 g / 100 mL de slurry) sobre propiedades de la película como el color, la solubilidad en agua (WS), las propiedades mecánicas y la microestructura de la matriz compuesta. Se observó que la incorporación de 0,2% de PRB a películas sin antimicrobianos (S2) aumentó la tendencia al amarillo, maximizó el esfuerzo a la tracción y la deformación a la ruptura y, a su vez, redujo la WS en comparación con la película control (C). Es de destacar que el agregado de mayores concentraciones de PRB produjo un efecto negativo sobre las propiedades mecánicas, debido a una deficiente distribución del relleno y al fenómeno de floculación, que debilitaron la matriz compuesta. Asimismo, la aplicación de ultrasonido en este relleno para la disminución de su tamaño de partícula, no brindó las mejoras esperadas al ser incorporado en las formulaciones.

Posteriormente, se estudió la incorporación de los antimicrobianos a la formulación de las películas observándose una reducción del esfuerzo a la ruptura y del módulo de Young y un aumento de la solubilidad en agua en todas las formulaciones. Adicionalmente, la evaluación de la película activa S2NANI_f, permitió demostrar la disponibilidad de los antimicrobianos para difundir en un medio semisólido, como así también la acción efectiva de la película frente a una contaminación combinada por *S. cerevisiae* y *L. innocua*, ya sea que esta ocurra previa o posteriormente a la aplicación de las películas.

Asimismo, fue posible desarrollar y aplicar recubrimientos comestibles a base de almidón de mandioca soportando NANI y adicionados con PRB. En base a los resultados obtenidos para el queso Port Salut recubierto y almacenado a temperatura de abuso de refrigeración, se estableció que el recubrimiento SNANI_{3c} presentó una eficacia antimicrobiana equivalente a la película S2NANI_f. Por lo tanto, para inhibir el desarrollo de un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *L. innocua*, es posible aplicar tanto la película S2NANI_f como el recubrimiento S2NANI_{3c}.

De acuerdo con lo antedicho, se puede concluir que las películas de almidón adicionadas con 0,2% de PRB resultan de gran interés para mejorar sus propiedades

mecánicas. A su vez, las películas y recubrimientos con 0,2% de PRB y conteniendo NANI, constituyen matrices activas efectivas para mejorar la estabilidad del queso y son buenas barreras frente a la contaminación externa y post-proceso en los sistemas evaluados.

CAPÍTULO 3

Elaboración y caracterización de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos y reforzados con expeller de soja

1 Introducción

El expeller, pellet o extrudado de soja es un sub-producto obtenido del prensado por extrusión de la soja para obtener el aceite. Es rico en fibra (del 30 al 50 %) y proteínas (alrededor del 46 %) (Fu y col., 2017). En la actualidad, la principal aplicación de la torta de expeller es la alimentación animal, y solo una pequeña parte está industrializada. Por lo tanto, es interesante evaluar otros usos para reducir este sub-producto de la industria alimentaria y, al mismo tiempo, generar valor agregado, brindando beneficios económicos y ambientales (Paolilli y col., 2019). Es importante remarcar, que existe poca información sobre el uso del expeller de soja como relleno de películas compuestas biodegradables.

Objetivos

En el presente capítulo, el expeller de soja fue utilizado como relleno para generar matrices de almidón compuestas (películas y recubrimientos).

Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Estudiar las propiedades mecánicas y fisicoquímica (color y solubilidad en agua) de las películas comestibles compuestas desarrolladas.
- ✓ Estudiar el efecto de la adición de expeller de soja y glicerol, en diferentes proporciones, sobre las propiedades físicas (solubilidad en agua, contenido de humedad, color y resistencia mecánica) de películas comestibles biocompuestas a base de almidón de mandioca y adicionadas con natamicina y nisina. A su vez, se buscó obtener un sistema con propiedades optimizadas.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de las películas comestibles compuestas formuladas sobre queso Port Salut argentino frente a una contaminación simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*, a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.
- ✓ Desarrollar recubrimientos comestibles a base de almidón de mandioca con agregado de expeller de soja sonificado y/o antimicrobianos naturales.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos comestibles compuestos en queso Port Salut argentino frente a una contaminación simultánea de *Saccharomyces cerevisiae* y *Listeria innocua*.

2 Materiales y Métodos

2.1 Tratamiento del Expeller de soja

Dado que el tamaño de las partículas de expeller de soja obtenidas por separación con tamices y con un rendimiento aceptable, se encontraba en el orden del espesor de las películas, las mismas resultaron poco homogéneas y opacas. Por este motivo, se decidió aplicar un tratamiento adicional que proporcionara una cantidad adecuada de partículas de menor tamaño. El tratamiento del expeller de soja se llevó a cabo de la siguiente manera: en un vaso de precipitados se colocaron 0.7 g de expeller de soja R-Mix SRL, Urdinarrain, Entre Ríos, Argentina previamente molido y tamizado (Castellanos y col., 2020) junto con 70 mL de agua bidestilada en un recipiente de 100 mL. Luego se aplicó ultrasonido (VCX-750, Sonics Vibra Cell, USA) por 30 minutos con una amplitud del 80% utilizando una punta de titanio de 13 mm de diámetro con el objetivo de lograr una disminución de tamaño de partícula. A fin de controlar la temperatura de la suspensión, la sonicación se llevó a cabo con la muestra sumergida en un baño de hielo.

2.2 Caracterización del Expeller de soja sonicado. Contenido proximal

El análisis proximal (humedad, proteína, ceniza, fibra, lípidos y carbohidratos) del expeller de soja sonicado (SSE) se determinó según lo descrito en el **Capítulo 2 sección 2.3** y los resultados se expresaron como g 100 g⁻¹ de muestra húmeda.

2.3 Tamaño de partícula del Expeller de soja sonicado

Se determinó el tamaño de partícula del expeller de soja tamizado y del sonicado a temperatura ambiente mediante dispersión de luz estática usando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra) provisto de un láser He-Ne (λ 633 nm). La distribución de tamaño se describió utilizando los diámetros (μm) $d(0,1)$, $d(0,5)$ y $d(0,9)$ como se detalló en el **Capítulo 2 sección 2.4**.

2.4 Preparación de las películas y recubrimientos con expeller de soja

Se prepararon diferentes formulaciones de películas de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Capítulo 2 sección 2.7**.

- a) formulaciones a base de almidón de mandioca (5 g) y glicerol (2 g) sin antimicrobianos: control (C) y con adición de 0,2 g (Exp2), 0,3 g (Exp3) y 0,4 g (Exp4) de expeller de soja sonicado (SSE).
- b) formulaciones con antimicrobianos, utilizando 5 g de almidón de mandioca, 0,0068 g de natamicina, 0,027 g de nisina y la cantidad de glicerol y SSE requerida de acuerdo con el diseño experimental utilizado (**Tabla 3.1**).

Todos los sistemas se completaron hasta 100 mL de suspensión con agua. A fines comparativos, se prepararon tres sistemas control de manera similar, pero sin adición de antimicrobianos (Exp), sin adición de SSE (CNANI) y sin adición de antimicrobianos ni SSE (C), para determinar la influencia de SSE y antimicrobianos en las propiedades de la película.

Tabla 3.1: Niveles de SSE y Gly a partir del Diseño Central Compuesto para la elaboración de películas a base de almidón de mandioca con natamicina y nisina, reforzadas con expeller de soja sonicado (g 100 mL⁻¹ slurry)

Corrida	SSE	Gly
1	0,2 (-1)	2 (+1)
2	0,2 (-1)	1,6 (-1)
3	0,3 (0)	1,8 (0)
4	0,4 (+1)	2 (+1)
5	0,5 (+2)	1,8 (0)
6	0,3 (0)	1,8 (0)
7	0,3 (0)	1,8 (0)
8	0,3 (0)	1,4 (-2)
9	0,1 (-2)	1,8 (0)
10	0,3 (0)	2,2 (+2)
11	0,4 (+1)	1,6 (-1)

SSE: expeller de soja sonicado, Gly: glicerol.

Los valores entre paréntesis corresponden al nivel codificado de SSE y Gly

2.5 Diseño experimental basado en la metodología de superficie de respuesta

La influencia del contenido de glicerol y SSE sobre los valores de humedad, solubilidad, color y propiedades mecánicas de las películas se estudió modulando las dos variables independientes seleccionadas a cinco niveles de acuerdo con un Diseño Central Compuesto (DCC), como se detalla en la **Tabla 3.1**. Este diseño se aplicó a fin de minimizar la cantidad de sistemas posibles a estudiar.

Se utilizó un software estadístico (Statgraphics centurion XVI.I Statsoft, USA) para la generación del diseño y para ajustar los datos experimentales a una función polinomial de segundo grado (**ecuación 3.1**):

$$\psi = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_{11}x_1^2 + B_{22}x_2^2 + B_{12}x_1x_2 \quad (3.1)$$

donde, ψ es la variable dependiente genérica examinada; B_0 es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño (0,0); B_1 y B_2 son los coeficientes de regresión lineal; B_{11} y B_{22} son los coeficientes de regresión cuadráticos y B_{12} es el coeficiente de regresión de productos cruzados; x_1 y x_2 son las variables independientes (Gly y SSE). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la adecuación de la ecuación, utilizando el test de falta de ajuste ($p > 0,05$) y el coeficiente de determinación (R^2). Adicionalmente, se evaluó la significancia estadística de los diferentes coeficientes de la ecuación. El análisis de la superficie de respuesta se completó generando gráficos de respuesta tridimensionales (Statgraphics centurion XVI.I Statsoft, USA).

2.5.1 Optimización

Los niveles de SSE y Gly que optimizaron las características de las películas estudiadas se estimaron mediante el procedimiento de la función deseabilidad (Arismendi y col., 2013). La optimización de las variables respuesta evaluadas tanto de manera individual como múltiple, se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics centurion XVI.I Statsoft, USA).

2.6 Caracterización fisicoquímica de las películas comestibles

Las películas fueron analizadas determinando su espesor, propiedades mecánicas, color, solubilidad y humedad según se describió en el **Capítulo 2 sección 2.8**.

2.7 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR de las películas se obtuvo utilizando un espectrofotómetro (V5.3.1 Spectrum, Perkin Elmer Inc., USA) provisto de un accesorio de Reflexión Total Atenuada (ATR) con las condiciones descritas en el **Capítulo 2 sección 2.8.6**.

2.8 Propiedades térmicas

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los termogramas de DSC fueron adquiridos por un calorímetro 822e Mettler Toledo (Schwerzenbach, Suiza) y se realizaron para determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras. Las curvas de DSC se obtuvieron calentando la muestra previamente colocada en una celda de aluminio herméticamente cerrada, de 25 °C a 160 °C a 5 °C/min, manteniendo esta temperatura durante 5 min, seguido de un enfriamiento a -10 °C a 5 °C/min, manteniendo esta temperatura durante 5 min y un segundo ciclo de calentamiento hasta 160 °C a 5 °C/min. Se usó una celda vacía como referencia. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó a través de un equipo Termoanalizador simultáneo (TG-DSC/DTA TA Instruments SDT Q600 con flujo de N_2). Se colocaron alrededor de 8 mg de muestra en crisoles de alúmina y se realizó la corrida en un rango de temperaturas de 25 °C a 700 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar la morfología de la superficie de las películas y de sus secciones transversales (Zeiss Supra 40 Carl Zeiss, Alemania). La preparación de las muestras fue similar a la descrita en el **Capítulo 2 sección 2.8.7.b**.

2.10 Biodegradabilidad

La evaluación de la biodegradabilidad de las películas óptima (ExpNANI) y CNANI se realizó por el método descrito por Silva y col. (2020), degradación por entierro en suelo, con algunas modificaciones. Las películas se cortaron (2 cm x 2 cm) y se colocaron sobre mallas de acero inoxidable. Posteriormente, estas muestras se colocaron en bandejas de poliestireno expandido con 1 cm de compost (Terra nostra, Argentina): 10% humus de lombriz, 35% turba, 25% corteza de pino, 15% estiércol de ganado, 10% tierra negra, 5% otros, y se cubrieron con 4 cm adicionales de compost para exponer las películas a la microflora natural. Se rociaron con agua 4 veces al día para mantener la humedad del suelo, registrándose humedad y temperatura. Diariamente, las muestras fueron extraídas del compost, lavadas con agua corriente en forma de lluvia para eliminar los residuos superficiales del compost y fotografiadas para registrar su degradación. El ensayo finalizó cuando no se obtuvieron restos de película visible.

2.11 Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos comestibles

2.11.1 *Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)*

La difusión de los antimicrobianos sobre un medio semisólido (agar PCA) fue evaluada con el sistema óptimo ExpNANI y un control CNANI según se describió en el **Capítulo 2 sección 2.9.1**.

2.11.2 *Actividad de barrera antimicrobiana de las películas y los recubrimientos sobre queso Port Salut*

Se analizó la actividad de barrera antimicrobiana de las películas optimizadas y de los correspondientes recubrimientos (ExpNANI), y se la comparó con un sistema sin antimicrobianos (Exp), un control sin expeller (CNANI) y con un queso sin recubrir. El procedimiento realizado se describió en el **Capítulo 1 secciones 1.9.2 y 1.9.3**.

2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó según lo detallado en el **Capítulo 2 sección 2.10**.

3 Resultados y Discusión

3.1 Distribución de tamaño de partículas

La distribución de tamaño de partículas del expeller de soja después del tamizado (sin sonicar) y luego del sonicado (SSE) se muestra en la **Figura 3.1**. Según el tamaño de la malla utilizada para el tamizado, las partículas deben ser inferiores a 212 μm , los valores de $d(0.1)$, $d(0.5)$ y $d(0.9)$ fueron de 7 μm , 46 μm y 115 μm , respectivamente. Para el SSE se observan tamaños inferiores respecto al expeller sin sonicar, además de una distribución asimétrica, donde los diámetros $d(0.1)$, $d(0.5)$ y $d(0.9)$ fueron de 7 μm , 30 μm y 84 μm , respectivamente. La diferencia observada entre los valores del diámetro ponderado en superficie, $D [3,2]$ (17 μm) y del diámetro ponderado en volumen $D [4,3]$ (43 μm) para las partículas de SSE, indicaron que las partículas diferían en tamaño y forma.

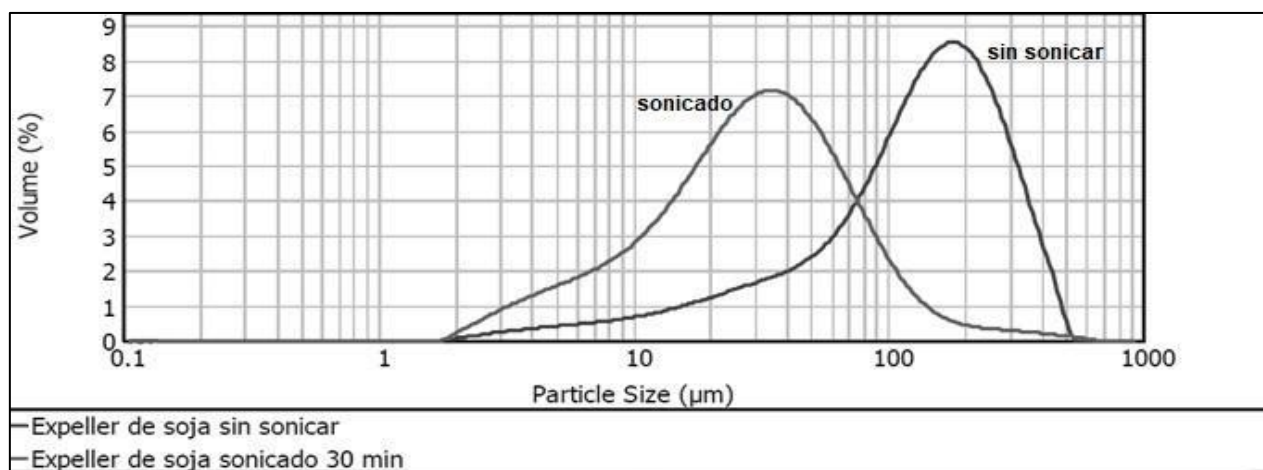


Figura 3.1 – Distribución de tamaño de partícula de expeller de soja sin sonicar y sonicado.

Por otro lado, en la **figura 3.2.a** se observa el expeller de soja sin sonicar de mayor tamaño que el expeller de soja sonicado (**figura 3.2.b**). Los primeros presentaron partículas de entre 210 y 110 μm y SSE de entre 10 y 80 μm , acorde con los resultados obtenidos en el estudio de distribución del tamaño de partículas. Asimismo, el expeller sin tratar presentó una morfología de bloques compactos mientras que SSE resultó similar a filamentos delgados.

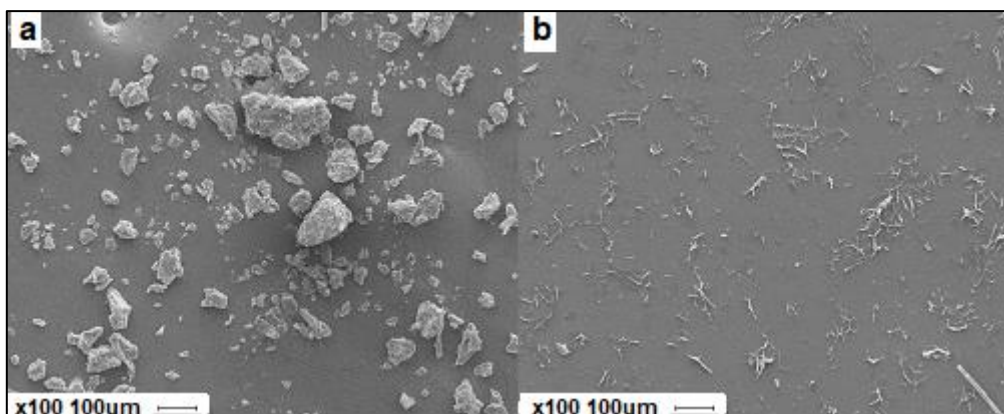


Figura 3.2 - Micrografías SEM de expeller de soja sin sonicar (a) y expeller de soja sonicado (b).

3.2 Análisis proximal del expeller de soja sonicado (SSE)

Según el análisis proximal del SSE (**Tabla 3.2**), la proteína y la fibra son los principales componentes presentes. Se puede observar que no hay diferencias en la composición entre el expeller de soja no sonicado y el SSE debido al tratamiento con ultrasonido y la liofilización.

Un estudio de expeller de soja en Argentina realizado por Juan y col. (2016) presentó los siguientes resultados: humedad de $6,8 \pm 1,8\%$ b.h., proteína de $43,5 \pm 1,9\%$ b.h., grasa de $8,5 \pm 1,8\%$ b.h., ceniza de $6,1 \pm 0,26\%$ b.h., siendo estos resultados concordantes con los de la presente investigación.

Tabla 3.2 – Análisis proximal de expeller de soja sin sonicar y sonicado (SSE).
Expresados en g 100 g⁻¹ muestra (base húmeda).

Componentes	SSE	sin sonicar
Humedad	5,8 ± 0,5 ^a	5,9 ± 0,3* ^a
Cenizas	6,7 ± 0,2 ^a	6,1 ± 0,26 * ^a
Proteínas	42 ± 3 ^a	40,0 ± 0,2* ^a
Fibra**	30,2 ± 0,5 ^a	30,69 ± 0,02 ^a
Lípidos	6 ± 2 ^a	8,2 ± 0,3 ^a
Carbohidratos	9,3 ± 2,1 ^a	9,6 ± 0,3 ^a

*Los valores mostrados son un promedio (n=3) y la desviación estándar correspondiente. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0,05) entre el expeller no sonicado y el SSE. * Castellanos Fuentes y col. 2020 **AOAC 991.4 3*

3.3 Caracterización fisicoquímica de películas

En una primera etapa se evaluaron los parámetros de color, las propiedades mecánicas y la solubilidad en agua de películas a base de almidón con agregado de SSE sin antimicrobianos. Se consideraron concentraciones capaces de generar películas aptas para su uso y manipulación (se muestra un ejemplo en la **Figura 3.3**). Concentraciones mayores a 0,4 g de SSE / 100 ml slurry, produjeron aglomeraciones, distribución heterogénea y no fue posible la generación de una matriz adecuada.



Figura 3.3 – Distribución homogénea del expeller de soja sonicado (SSE) en películas a base de almidón de mandioca con 0.4 g de SSE (Exp4).

3.3.1 Propiedades mecánicas: ensayos de tracción

En la **Figura 3.4** y en la **Tabla 3.4** se presentan las propiedades mecánicas de las películas control y con SSE (Exp2, Exp3 y Exp4). Se observó una tendencia al aumento del esfuerzo a la ruptura con el agregado de expeller, resultando significativamente mayor en las películas con el mayor contenido (Exp4), con valor de 1.6 ± 0.2 MPa, en comparación con el sistema control. Asimismo, se observó un aumento en la deformación a la ruptura con incorporación de expeller, el valor más alto se obtuvo para Exp2 y Exp4 (0.80-0.90). Esto puede deberse a la presencia de componentes solubles (proteínas, carbohidratos) que actuarían como plastificantes. Es decir, si bien la presencia de estos componentes genera una matriz flexible, la fibra presente proporciona mayor resistencia y refuerzo. Por lo tanto, la incorporación de este relleno proporcionó una mejora en las propiedades mecánicas de las películas respecto a las películas control. Esto promueve la aplicación de las películas como envase para distintos alimentos al generarse una matriz reforzada favorecida por la compatibilidad almidón-expeller.

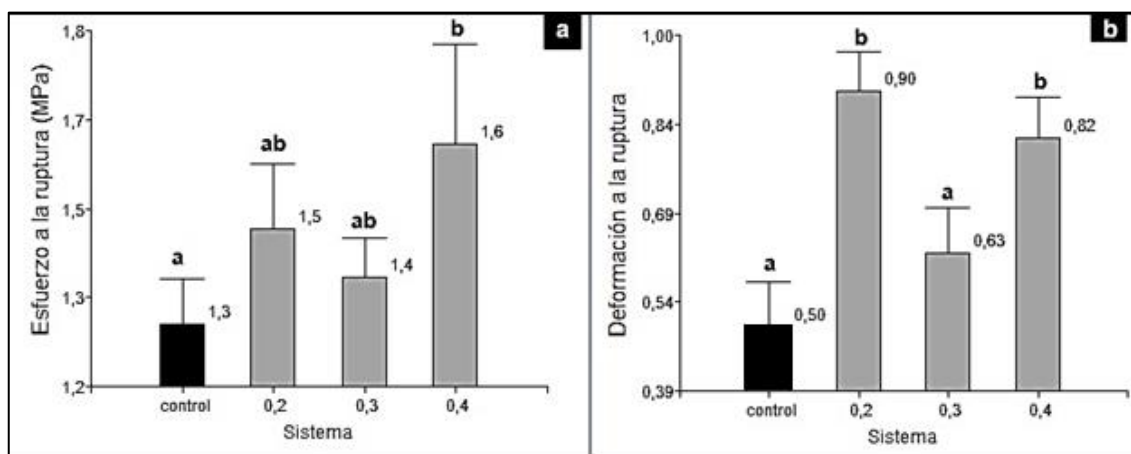


Figura 3.4– Propiedades mecánicas de películas control y con expeller de soja sonificado. a) esfuerzo a la ruptura (MPa), b) deformación a la ruptura,

Versino y García (2014) observaron un aumento del esfuerzo con aumento del relleno (fibra natural de yuca) en películas a base de almidón de yuca, confirmando el carácter de refuerzo del material.

3.3.2 Evaluación del Color

En la **Tabla 3.3** pueden observarse los parámetros L^* , a^* , b^* y el índice de amarillo (YI) para las películas control (C), y con 0,2 (Exp2), 0,3 (Exp3) y 0,4g (Exp4) de expeller de soja sonicado. Las películas con SSE presentaron una luminosidad significativamente superior al control (L^*) y menor tendencia al amarillo con valores de b^* inferiores. Del mismo modo, presentaron una menor tendencia al verde con valores de a^* superiores. Se observaron estas tendencias con el aumento en las concentraciones de SSE presente en las películas. Es importante mencionar que el color de las películas podría influenciar en la aceptabilidad del consumidor, al aplicarse sobre un alimento.

Tabla 3.3– Parámetros CieLab L^* , a^* , b^* e índice de amarillo para películas control y con expeller de soja sonicado

sistemas	L^*	a^*	b^*	YI
C	88 ± 1^a	$-1,18 \pm 0,06^a$	$3,7 \pm 0,3^c$	$6,7 \pm 0,5^a$
Exp2	95 ± 1^b	$-0,01 \pm 0,16^b$	$2,4 \pm 0,4^a$	$5,9 \pm 0,78^a$
Exp3	$96,3 \pm 0,5^c$	$-0,16 \pm 0,03^c$	$2,5 \pm 0,3^a$	$6,0 \pm 0,6^a$
Exp4	$96,2 \pm 0,5^{bc}$	$-0,21 \pm 0,03^c$	$2,9 \pm 0,3^b$	$6,4 \pm 0,2^a$

3.3.3 Solubilidad en agua (WS)

En la **Tabla 3.4** puede observarse la solubilidad de los distintos sistemas evaluados. Las películas con expeller presentaron una menor solubilidad que las películas control resultando más resistentes al agua. En particular, la solubilidad disminuyó con aumento del contenido de expeller siendo cercana al 16% para Exp4. Esto puede deberse a la generación de una matriz reforzada (compatibilidad en la interfaz SSE – almidón) que disminuye la interacción con el agua.

De manera similar, Edhirej y col. (2017) observaron una disminución de la solubilidad con aumento del contenido de fibra de azúcar de palma en películas a base de almidón y bagazo. La menor solubilidad fue cercana al 14% con un contenido de 0.4% de fibra.

Tabla 3.4 – Solubilidad, esfuerzo a la ruptura (MPa) y deformación a la ruptura de películas control y con expeller de soja sonicado.

	Solubilidad (%)	Esfuerzo a la ruptura (MPa)	Deformación a la ruptura	Módulo de Young (MPa)
C	34,6 ± 0,9 ^c	1,3 ± 0,1 ^a	0,50 ± 0,03 ^a	7,5 ± 0,2 ^c
Exp2	19 ± 2 ^b	1,5 ± 0,1 ^{ab}	0,90 ± 0,03 ^c	5,1 ± 0,2 ^a
Exp3	18 ± 1 ^a	1,4 ± 0,1 ^a	0,63 ± 0,03 ^b	5,5 ± 0,2 ^a
Exp4	16 ± 1 ^a	1,6 ± 0,2 ^b	0,82 ± 0,03 ^c	6,7 ± 0,2 ^b

Estos ensayos permitieron establecer que un rango de SSE entre 0,2 y 0,4 g / 100 mL de slurry, fue adecuado para elaborar películas con propiedades de solubilidad, color y mecánicas apropiadas para continuar con los estudios de optimización.

3.4 Efecto del contenido de glicerol y expeller de soja sonicado sobre las propiedades físicas de las películas antimicrobianas

Los sistemas conteniendo natamicina y nisina enumerados en la **Tabla 3.1** (diseño central compuesto) generaron películas homogéneas, flexibles y maleables que fueron evaluadas a través de diferentes parámetros físicos (**Tabla 3.5**).

Los datos de solubilidad, contenido de humedad y parámetros mecánicos pudieron ajustarse a un modelo cuadrático con valores apropiados de R² y del estadístico de falta de ajuste (p). Los resultados del ANOVA de estas respuestas evaluadas se indican en la **Tabla 3.6**. El modelo propuesto no presentó falta de ajuste significativo (p > 0.0512) y los valores de R² oscilaron entre 70,7 y 95,9, lo que sugiere que el modelo predijo adecuadamente las respuestas obtenidas. Sin embargo, no fue posible describir satisfactoriamente las respuestas de los parámetros de color. Probablemente debido a que se obtuvieron valores muy similares (p > 0.05) para las formulaciones estudiadas (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.5: Diseño Central Compuesto: respuestas obtenidas para WS: solubilidad, TS: esfuerzo a ruptura, SB: deformación a ruptura, MY: módulo de Young

Run	L*	a*	b*	YI	Humedad %bh	WS %bh	TS MPa	SB	MY MPa
1	83 ± 1 ^{ab}	-0,1 ± 0,2 ^{bc}	12,9 ± 0,9 ^{cd}	24 ± 1 ^{bcd}	32,1 ± 0,3 ^b	33,0 ± 0,8 ^e	0,30 ± 0,04 ^a	3,6 ± 0,1 ^c	0,5 ± 0,1 ^b
2	82 ± 2 ^{ab}	0,2 ± 0,5 ^{bcd}	13 ± 1 ^{bcd}	26 ± 3 ^{abc}	35,0 ± 0,5 ^c	26,4 ± 0,4 ^c	0,50 ± 0,08 ^c	2,8 ± 0,3 ^c	0,4 ± 0,1 ^b
3	82 ± 1 ^a	0,5 ± 0,8 ^d	13,7 ± 0,5 ^d	27 ± 1 ^{cd}	30,5 ± 0,5 ^d	26,7 ± 0,6 ^c	0,64 ± 0,03 ^c	1,9 ± 0,4 ^b	0,90 ± 0,04 ^c
4	85,1 ± 0,7 ^{cde}	0,2 ± 0,1 ^{bcd}	12,7 ± 0,7 ^{bcd}	26,1 ± 0,8 ^{abcd}	30,9 ± 0,4 ^b	30,3 ± 0,5 ^d	0,32 ± 0,05 ^a	1,3 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,1 ^{ab}
5	83,2 ± 0,9 ^{abc}	0,5 ± 0,2 ^d	14,1 ± 0,6 ^d	29,2 ± 0,4 ^d	26,5 ± 0,6 ^a	23,4 ± 0,2 ^b	0,65 ± 0,04 ^c	1,9 ± 0,2 ^b	0,53 ± 0,09 ^b
6	84 ± 1 ^{bcde}	0,3 ± 0,1 ^{cd}	12,8 ± 0,5 ^{cd}	26,8 ± 0,4 ^{bcd}	31,0 ± 0,8 ^d	26,6 ± 0,3 ^c	0,57 ± 0,05 ^c	2,2 ± 0,2 ^b	0,86 ± 0,07 ^c
7	83 ± 2 ^{abcd}	0,3 ± 0,3 ^{cd}	14 ± 1 ^d	28 ± 3 ^{cd}	30,4 ± 0,5 ^d	25,3 ± 0,3 ^c	0,6 ± 0,2 ^c	1,8 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,4 ^c
8	85 ± 1 ^e	-0,3 ± 0,2 ^b	12 ± 1 ^{abc}	24 ± 2 ^{ab}	38,3 ± 0,6 ^e	22,9 ± 0,5 ^b	1,1 ± 0,2 ^c	1,1 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,3 ^e
9	85 ± 1 ^{de}	0,04 ± 0,25 ^{bcd}	12 ± 1 ^{abc}	24 ± 2 ^{ab}	36,5 ± 0,2 ^{ce}	30,2 ± 0,4 ^d	0,2 ± 0,2 ^a	3,0 ± 0,2 ^c	0,3 ± 0,1 ^a
10	82 ± 1 ^a	-0,8 ± 0,4 ^a	12 ± 2 ^{ab}	27 ± 4 ^{abc}	36,3 ± 0,4 ^{ce}	26,0 ± 0,6 ^c	0,41 ± 0,03 ^b	3,2 ± 0,3 ^c	0,4 ± 0,1 ^b
11	81,9 ± 0,8 ^a	-1,3 ± 0,5 ^a	10,7 ± 0,6 ^a	23 ± 2 ^a	31,3 ± 0,7 ^b	21,0 ± 0,4 ^a	0,7 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,2 ^d

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas

Tabla 3.6 Coeficientes del modelo polinomial de segundo grado para diferentes respuestas y análisis ANOVA.

Coeficiente	Humedad	WS	TS	SB	YM
B₀	196,5	-4,6	3,4	0,42	14,5
Lineal B₁	-162,9**	43,0**	-3,7***	0,88**	-19,2***
Lineal B₂	-90,3***	-84,8**	6,8**	-2,5**	41,3
cuadrático B₁₁	41,8***	-12,2	1,0**	0,81	6,0**
cuadrático B₂₂	22,2	10,0	-4,2**	11,6	-13,4
Interacción B₁₂	31,2	33,8	-1,9	-5,4	-17,6
Adecuación					
Falta de ajuste (p)	0,0624	0,0512	0,0559	0,0809	0,0837
R²	95,94	70,69	86,95	76,68	87,51

1: Gly, 2: SSE ** Significativo a $P < 0,05$. ***Significativo a $P < 0,01$.

YI: índice amarillo, WS: solubilidad en agua, TS: esfuerzo a la tracción,

SB: deformación a la ruptura, YM: módulo de Young

Los valores de humedad se vieron afectados principalmente por un término lineal de SSE negativo, mientras que el término cuadrático de Gly afectó positivamente. Por el contrario, los valores de solubilidad se vieron afectados positivamente por el término lineal de Gly mientras que negativamente por el término lineal de SSE. Azarifar y col. (2019) afirman que la solubilidad es un buen indicador de la resistencia de las películas al agua y se vuelve importante cuando las películas se encuentran con alimentos con alto contenido de humedad, especialmente durante el almacenamiento. Estos autores observaron que un aumento en el contenido de nanofibras de quitina reducía la solubilidad de la película a base de gelatina gracias a que estas rellenaron espacios vacíos en regiones amorfas de la matriz y, en consecuencia, disminuyeron la movilidad y flexibilidad de las cadenas. Sin embargo, las altas concentraciones de nanofibras tuvieron un efecto opuesto sobre esta propiedad, posiblemente debido a la distribución no uniforme de las partículas en la película.

Adicionalmente, los valores en el esfuerzo a la ruptura se vieron afectados negativamente por el término lineal de Gly mientras que el término lineal de SSE influyó positivamente, los términos cuadráticos tuvieron mucha menos influencia. Por el contrario, la deformación a la ruptura se vio afectada negativamente por el término

lineal de SSE, pero positivamente por el término lineal de Gly. Por otro lado, el término lineal Gly, negativamente, y el término cuadrático, positivamente, influyeron en los valores del módulo de Young, pero no hubo influencia significativa del contenido de SSE. Se pudo observar que los parámetros relacionados con la interacción SSE-Gly no fueron significativos, sugiriendo que la influencia del contenido de Gly fue independiente de la influencia del contenido de SSE en todas las propiedades evaluadas. Galicia-García y col. (2012) demostraron que, al disminuir el contenido de fibra en matrices a base de almidón fosforilado o almidón nativo, el TS disminuyó y la SB aumentó, por lo que la fibra actuó como refuerzo. Adicionalmente, Nandane y Jain (2018) concluyeron que, al aumentar el contenido de aislado de proteína de soja en películas a base de carboximetilcelulosa aumentó TS, mientras que al aumentar el contenido de Gly, aumenta SB. Los plastificantes, como el glicerol, están destinados a disminuir las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas de polímeros, impartiendo una mayor flexibilidad de la película (Chillo y col., 2008).

Para comprender mejor los efectos de las variables Gly y SSE, se analizaron los gráficos de superficie de respuesta tridimensionales (**Figura 3.5**). Los valores más bajos de WS y SB se obtuvieron a las concentraciones más bajas de Gly y a las concentraciones más altas de SSE (**Figura 3.3b** y **3.3d**). Los valores de humedad más bajos y los valores más altos de TS y MY se obtuvieron a concentraciones más altas de SSE y una concentración intermedia de Gly, alrededor de 1.6 % (**Figuras 3.5a, 3.5c y 3.5e**). Un mayor contenido de Gly aumenta el contenido de humedad y disminuye TS y YM, posiblemente debido a su capacidad humectante y plastificante, dada por su bajo peso molecular y su estructura química (poli-alcohol con tres grupos hidroxilos que interactúan con el agua).

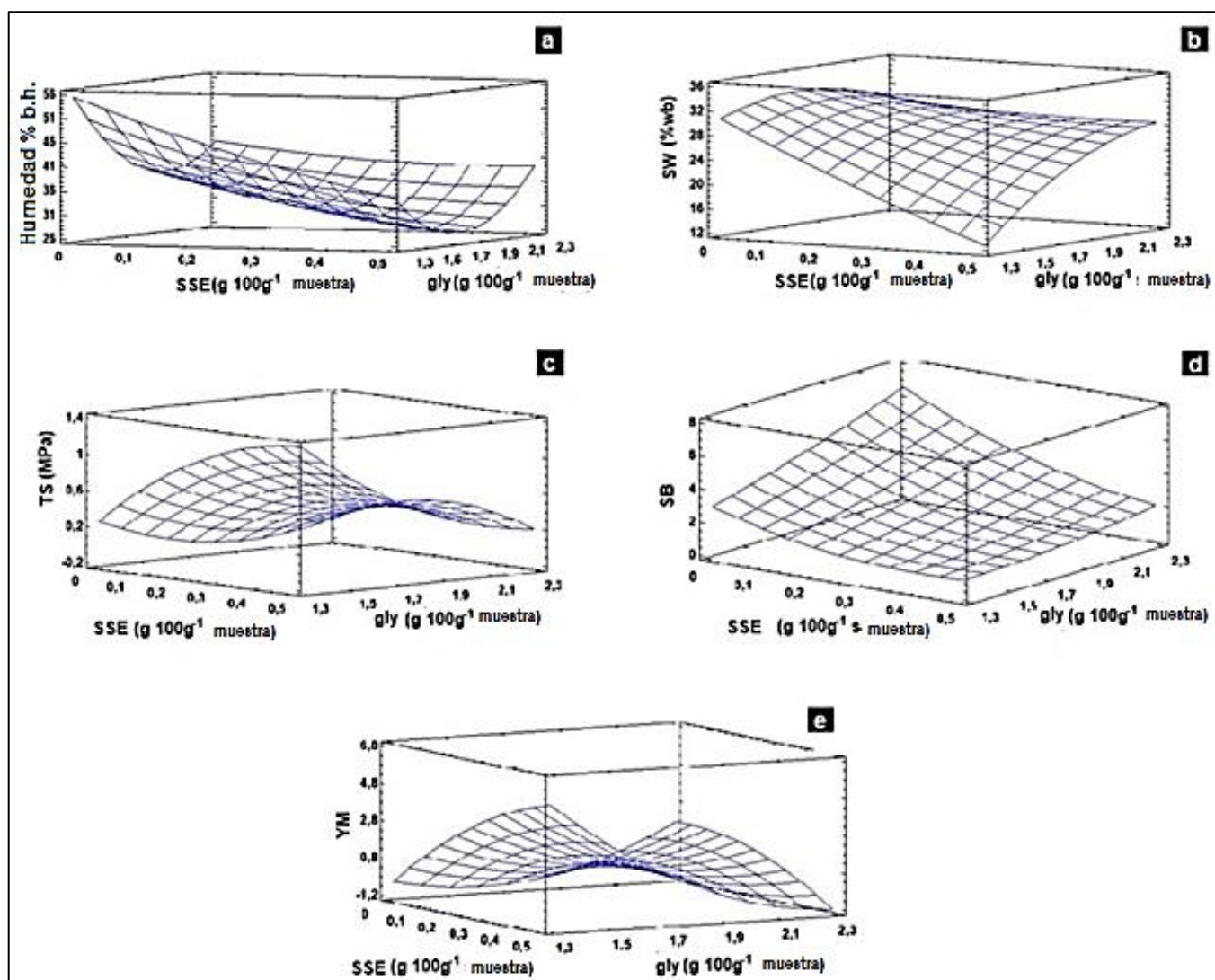


Figura 3.5- Superficie de Respuesta, efecto de la interacción glicerol (Gly) - expeller de soja sonicado (SSE) sobre las variables dependientes humedad (a), SW: solubilidad en agua (b), TS: esfuerzo a la ruptura (c), SB: deformación a la ruptura (d) y YM: Módulo de Young (e) de películas comestibles a base de almidón de mandioca.

3.5 Niveles óptimos de SSE y Gly de la película comestible y caracterización adicional

El propósito de la optimización fue maximizar el esfuerzo en el punto de ruptura del ensayo de tracción (mayor resistencia) y minimizar la solubilidad en agua. Cuando la función deseabilidad (D) se evaluó de forma global, lo que significa optimizar TS y WS simultáneamente, el valor de D fue 1.0, lo cual es altamente satisfactorio según lo informado por Arismendi y col. (2013). De esta manera, se obtuvieron los niveles de Gly y SSE que optimizaron las respuestas seleccionadas: 1,4 g Gly / 100 mL de slurry y 0,46 g SSE / 100 mL de slurry. Las respuestas predichas de acuerdo con la metodología

estadística empleada, fueron: TS = 1.11 MPa y WS = 17.6 %b.h. Por otro lado, los valores medidos experimentalmente de TS y WS de la película elaborada con los niveles óptimos de Gly y SSE, fueron $1,0 \pm 0,1$ MPa y $19,0 \pm 0,3$ % b.h. respectivamente, lo que indica que la predicción estadística fue satisfactoria.

En los siguientes apartados, se discutirá la influencia del agregado de SSE y de antimicrobianos sobre las siguientes propiedades: Permeabilidad al vapor de agua, Análisis termogravimétrico, Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, microscopía y actividad antimicrobiana. Para ello, se comparará la película seleccionada (ExpNANI) con las películas control (Exp, CNANI y C): Adicionalmente, la biodegradabilidad fue evaluada sobre la película ExpNANI y comparada con la de CNANI.

3.6 Propiedades mecánicas: ensayos de tracción sistema óptimo y controles

En la **Figura 3.6** pueden observarse los gráficos sobre las propiedades mecánicas del sistema óptimo (ExpNANI) y los diferentes controles. Se observó una disminución del esfuerzo a la ruptura debido a la presencia de los antimicrobianos mientras que aumentó en presencia de SSE (C: $1,3 \pm 0,1$; CNANI: $0,9 \pm 0,1$; Exp: $1,6 \pm 0,2$; ExpNANI: $1,1 \pm 0,1$ MPa). Asimismo, la deformación a la ruptura aumentó en presencia de los antimicrobianos y de SSE (C: $2,5 \pm 0,3$; CNANI: $3,0 \pm 0,4$; Exp: $0,8 \pm 0,1$; ExpNANI: $2,8 \pm 0,2$).

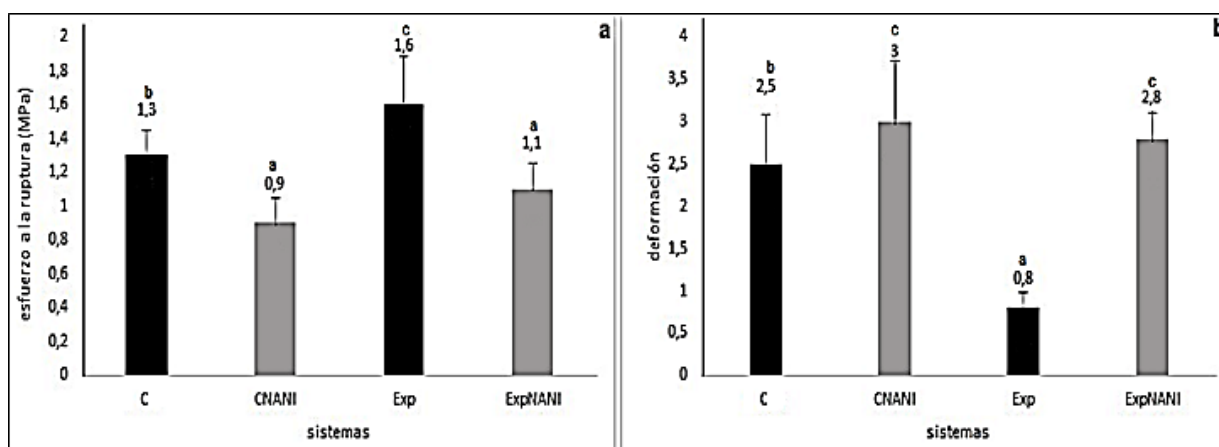


Figura 3.6 - Propiedades mecánicas de películas control sin antimicrobianos (C), película control con natamicina y nisina (CNANI), con expeller de soja sonicado (Exp) y con SSE, natamicina y nisina (ExpNANI). a) esfuerzo a la ruptura (MPa), b) deformación a la ruptura

3.7 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Las muestras ensayadas no mostraron diferencias significativas en PVA, siendo $(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ el valor promedio. En el **Capítulo 2 sección 3.2.3** se reportó un valor promedio de PVA que no difiere significativamente con este último. Se conoce que la PVA depende de la solubilidad y difusividad del vapor de agua. En la presente investigación, los diferentes rellenos utilizados en la elaboración de las películas probablemente afectaron dichas propiedades, modulando los resultados.

3.8 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó un análisis de los espectros ATR-FTIR para obtener información sobre la estructura química y la organización molecular de las distintas películas (**Figura 3.7**). Las curvas espectrales muestran bandas de absorbancia atribuidos a la estructura de los diferentes grupos funcionales. Todas las películas estudiadas mostraron una banda ancha en la región $3300\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$, que puede atribuirse al estiramiento O-H del agua y los grupos de las películas que interactúan mediante enlaces de hidrógeno (Manley, Van Zyl y Osborne, 2002). La intensidad de la banda O-H resultó mayor en las películas Exp, esto indica que hay mayor número de interacciones puente de Hidrógeno cuando el expeller está presente. Asimismo, la incorporación de los antimicrobianos generó una menor cantidad de interacciones puente de hidrógeno en comparación con el control (CNANI < C y ExpNANI < Exp), la intensidad más baja se obtuvo para las películas CNANI. En particular, para ExpNANI se observa que el máximo de Absorbancia está a menor número de onda ($3279,8 \text{ cm}^{-1}$), lo cual indica que en este caso hay puentes de Hidrógeno más fuertemente atraídos.

Las bandas situadas alrededor de 2925 cm^{-1} están relacionadas con las vibraciones de estiramiento C-H del CH_2 del C6 de la glucosa y se observaron en todas las películas. La señal situada en torno a 1650 cm^{-1} refleja la flexión del agua adsorbida y unida al almidón; es un pico característico de las matrices basadas en almidón (Fang y col., 2002). Según las intensidades observadas en dicha banda, la presencia de antimicrobianos y la presencia del SSE contribuyeron a aumentar la cantidad de agua retenida en la matriz (C: 35,4 % < CNANI: 43,5 % < ExpNANI: 46,2 % < Exp: 55,2 % b.h.).

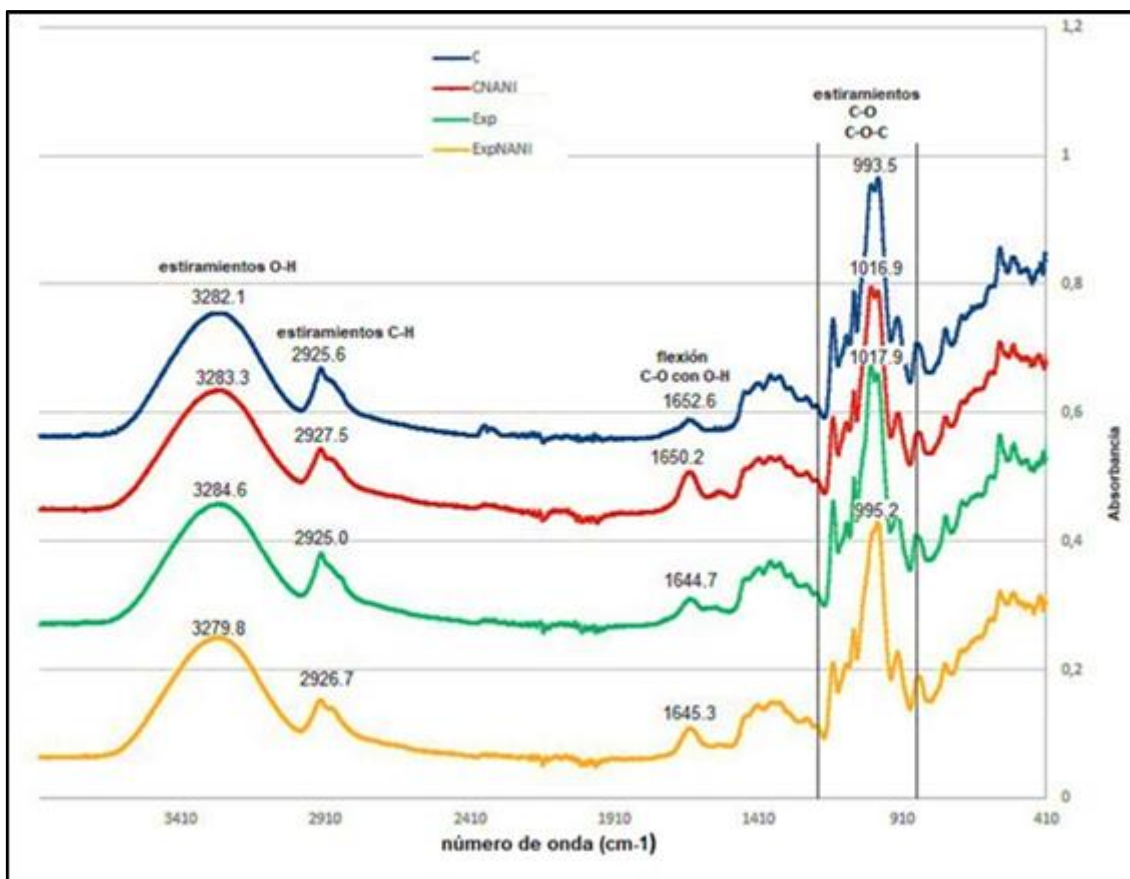


Figura 3.7 - Espectro de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de películas a base de almidón: control (C), con natamicina y nisina (CNANI), con expeller de soja sonicado (SSE) como relleno (Exp) y con SSE y los antimicrobianos (ExpNANI).

Chen y col. (2020) observaron que la banda a 3296 cm^{-1} se hacía más amplia y su intensidad aumentaba en las películas compuestas termoplásticas a base de almidón con el aumento de la carga de celulosa microcristalina (MCC) como relleno, sugiriendo la formación de muchas más interacciones de enlace de hidrógeno entre la MCC y el almidón.

Las vibraciones distintivas de los polisacáridos, como el almidón, se exhiben en la región $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, representando vibraciones de anillo combinadas con vibraciones de estiramiento de los grupos laterales C-OH, así como las vibraciones de enlace glicosídico del grupo C-O-C (Kacurakova, Capek, Sasinkova, Wellner, & Ebringerova, 2000).

Kocabas, y col. (2021) observaron que el espectro de la película de hemicelulosa pura cambió en varios números de onda al añadir nanocristales de celulosa (CNC) y

nanofibras de celulosa (CNF) comerciales a la formulación. La banda ancha de absorción a 3350 cm^{-1} , que se asigna al estiramiento O-H en la celulosa, presentó una mayor intensidad en las películas con CNC y CNF en comparación con la película de hemicelulosa pura debido a la presencia de celulosa. Lo mismo ocurrió con las bandas entre 1000 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} , que se asignaron al estiramiento C-O, al estiramiento asimétrico del anillo de glucosa y a la vibración asimétrica C-O-C en la celulosa.

Las vibraciones de estiramiento C-O y C-C contribuyen a las vibraciones en las bandas de 995 , 1080 y 1160 cm^{-1} y a la banda glicosídica C-O-C en el número de onda 860 cm^{-1} . En este rango se producen solapamientos y acoplamientos que dificultan la cuantificación de la intensidad, por lo que es difícil reconocer los modos vibracionales de grupos específicos. Se ha informado que algunos modos vibracionales están relacionados con cambios en la organización molecular y la hidratación de las estructuras del almidón. En particular, la banda de 995 cm^{-1} refleja cambios en las estructuras hidratadas del almidón, mientras que las bandas de 1022 y 1047 cm^{-1} son sensibles a cambios en las estructuras amorfas y ordenadas del almidón (Van Soest, Tournois, de Wit y Vliegenthart, 1995). Estas señales también podrían estar asociadas a la presencia de moléculas de glicerol (Bodirlau y col., 2013). Se ha propuesto que la relación de absorbancia $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ es un índice del orden en la región más cristalina, mientras que la relación $995\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ refleja el grado de organización de la doble hélice distribuida dentro de las estructuras cristalinas. No se observaron diferencias entre las relaciones de estas bandas en las diferentes películas analizadas (C: 0,85 - 1,02; CNANI: 0,86 - 1,00; Exp: 0,84 - 1,00; ExpNANI: 0,85 - 1,04, relación $1047\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ y $995\text{ cm}^{-1}/1022\text{ cm}^{-1}$ respectivamente), esto indica la presencia de estructuras de almidón hidratadas y similarmente organizadas (García-Valle y col., 2021). Por lo tanto, la incorporación de antimicrobianos y SSE, no alteró significativamente el grado de organización dentro de las estructuras semicristalinas de la matriz.

Bodirlau y col. (2013) observaron un desplazamiento muy ligero de las bandas en torno a 1650 cm^{-1} con la incorporación de micropartículas de almidón y cargas naturales (queratina, lignina y celulosa) en películas de biocompuestos a base de almidón. El ligero ensanchamiento de los picos, asociado a los grupos OH, sugería un aumento del número de modos de oscilación, que podría estar asociado a la presencia de diferentes tipos de interacciones de enlace de hidrógeno. Además, todos los picos que analizaron se desplazaron a un número de onda inferior al del almidón y concluyeron que se habían

formado nuevos enlaces de hidrógeno entre los componentes (interacciones evidentes entre los grupos hidroxilo y carbonilo del almidón y los grupos carbonilo, hidroxilo y éter presentes en las cargas). De forma similar, esto se observó en el presente trabajo con la adición de SSE y antimicrobianos en las películas ExpNANI.

3.9 Análisis térmico

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó la DSC para determinar los cambios que se producían en las temperaturas de transición vítrea (T_g) de las películas al añadir 0,46 % de SSE y/o los antimicrobianos. Se observó que el inicio del cambio de pendiente de la línea base, que marca la T_g , ocurrió a 89 ± 7 °C para la película C, mientras que el inicio se desplaza a alrededor de 70 ± 2 °C para la película CNANI que contiene los antimicrobianos, alrededor de 82 ± 2 °C para Exp que contiene SSE, y alrededor de 73 ± 5 °C para ExpNANI que contiene SSE y antimicrobianos (**Tabla 3.7**). Cabe destacar que estas temperaturas de transición se encuentran muy por encima de la temperatura ambiente, por lo tanto, todos los sistemas deshidratados resultan estables. Si bien la adición de relleno prácticamente no afectó a la T_g de las películas (la estructura amorfa de la matriz de almidón no se alteró), la adición de antimicrobianos la disminuyó. En estos últimos sistemas, la estructura de la matriz se vio comprometida y se produjo un aumento de la movilidad molecular. Estos resultados pueden relacionarse con los obtenidos en las propiedades mecánicas (**Figura 3.6**). Con respecto al segundo calentamiento, no se observaron diferencias en relación con el primero en las temperaturas onset y midpoint determinadas para cada sistema. Es decir, la historia térmica previa del material no generó cambios notables.

Menzel y col. (2019) observaron valores de T_g alrededor de los 70 °C para películas termoformadas a base de almidón y glicerol con cantidades similares a las evaluadas. Por otro lado, Chen y col. (2020) observaron que la adición de celulosa microcristalina (MCC) aumentó la T_g de películas compuestas a base de almidón termoplástico (TPS) debido a la interacción entre la MCC y la matriz de almidón. Adicionalmente, sostuvieron que la movilidad de la cadena molecular de TPS se vio afectada por el contenido de MCC (120 °C para 1wt% MCC/TPS y 133 °C para 6wt% MCC/TPS).

Tabla 3.7 Propiedades térmicas de las películas a base de almidón. Sistemas control (C), conteniendo nisina y natamicina (CNANI), conteniendo SSE (Exp) y conteniendo SSE y los antimicrobianos (ExpNANI): análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Sistemas	TGA				DSC	
	1er pico	2do pico	3er pico	4to pico	1er (°C) T _{onset}	2do (°C) T _{onset}
C	314 ± 2 ^a	---	503 ± 12 ^a	---	89 ± 7 ^c	87 ± 3 ^c
CNANI	282 ± 9 ^b	440 ± 3 ^a	495 ± 3 ^a	---	70 ± 2 ^a	70 ± 2 ^a
Exp	305 ± 2 ^a	---	530 ± 4 ^{ab}	587 ± 9	82 ± 2 ^{bc}	83 ± 2 ^{bc}
ExpNANI	285 ± 5 ^b	447 ± 6 ^a	513 ± 6 ^b	---	73 ± 5 ^{ab}	75 ± 8 ^{ab}
Nisina	244.5 ± 0.4	---	515 ± 2	---		
Natamicina	191.87 ± 0.03	444.1 ± 0.6	532 ± 2	---		

SSE: Expeller de soja sonicado Se indican la media y la desviación estándar (n=3). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas.

Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA se realizó para comprender el efecto del expeller de soja sonicado y los antimicrobianos sobre la estabilidad térmica de las películas. Diversos estudios han reportado que las películas a base de almidón que contienen glicerol se degradan térmicamente en tres etapas: la etapa uno entre 50 y 100 °C, indica la evaporación del agua absorbida del ambiente y el agua libre contenida; la segunda etapa está asociada a la evaporación de la fase rica en glicerina de 160 °C a 290 °C (evaporación máxima) y también se descompone parte del almidón contenido en la fase rica en glicerina; y la tercera etapa de 300 a 320 °C cuando se descompone la fase rica en almidón (Toro-Márquez et. al, 2018).

La película control, C, se comparó con las películas que contenían SSE y/o antimicrobianos (**Figura 3.8.a** y **3.9.b** y **Tabla 3.7**). El primer evento se produjo a temperaturas alrededor de los 100 °C, correspondiente a la pérdida de agua y otros compuestos de bajo peso molecular y volátiles (el pico es imperceptible, se consideran las pequeñas pérdidas de masa que registra el equipo). En las películas con antimicrobianos este evento se produce a temperaturas más bajas, es decir, en estas películas el agua y otros componentes se encuentran menos retenidos. Se produjo el

evento más significativo a aproximadamente 300 °C (**1er pico Tabla 3.7**), que representó la descomposición del almidón, deshidratación molecular para formar glucosa (Freitas y col., 2021; Kargarzadeh y col., 2017; Merci y col., 2019). En las películas con SSE, la descomposición del SSE se superpone a esta etapa. A su vez, las películas con antimicrobianos (CNANI y ExpNANI) presentaron la degradación de los antimicrobianos como puede inferirse de las curvas de TGA de nisina y natamicina (**Figura 3.8.c y 3.8.d**) y de la **Tabla 3.7**.

Chen y col. (2020) observaron que un aumento del contenido de celulosa microcristalina (MCC) en películas termoplásticas de almidón incrementaron las temperaturas de degradación de las películas. Atribuyeron esto a un aumento de los enlaces de hidrógeno formados por las moléculas de MCC y almidón a medida que aumenta el contenido de MCC.

Se observó que la inclusión de SSE y NANI a las películas permiten que éstas retengan un mayor contenido inicial de agua ya que los porcentajes obtenidos fueron mayores (39% para C, 59% para CNANI, 56% para Exp y 64% para ExpNANI). A 700 °C, el C tenía una masa residual del 4% mientras que ExpNANI un 12% que corresponde a cenizas de SSE y, probablemente, a residuos de sodio del soporte de nisina. Esto también puede verse en la **figura 3.8.c** donde la nisina presenta una masa residual mucho más alta.

Kargarzadeh y col. (2017) analizaron películas de biocompuestos de almidón con un 6% de nanocristales de celulosa (CNC) y las compararon con la matriz control. Observaron temperaturas de descomposición más altas de las películas en presencia de CNC como refuerzo, por lo tanto, lograron una mejor estabilidad térmica de las películas.

Kocabas, y col. (2021) compararon una película de hemicelulosa pura con una película que contenía un 10% (p/p) de nanocristales de celulosa comerciales y un 10% (p/p) de nanofibras de celulosa. Observaron que, para la película de hemicelulosa pura, el inicio de la degradación se determinó a 236 °C, mientras que en las películas reforzadas aumentó a 250 °C. A 600 °C, todas las películas tenían una masa residual del 35%, lo que concordaba con los datos de residuos sólidos (lignina-hemicelulosas obtenidas de mazorca de maíz).

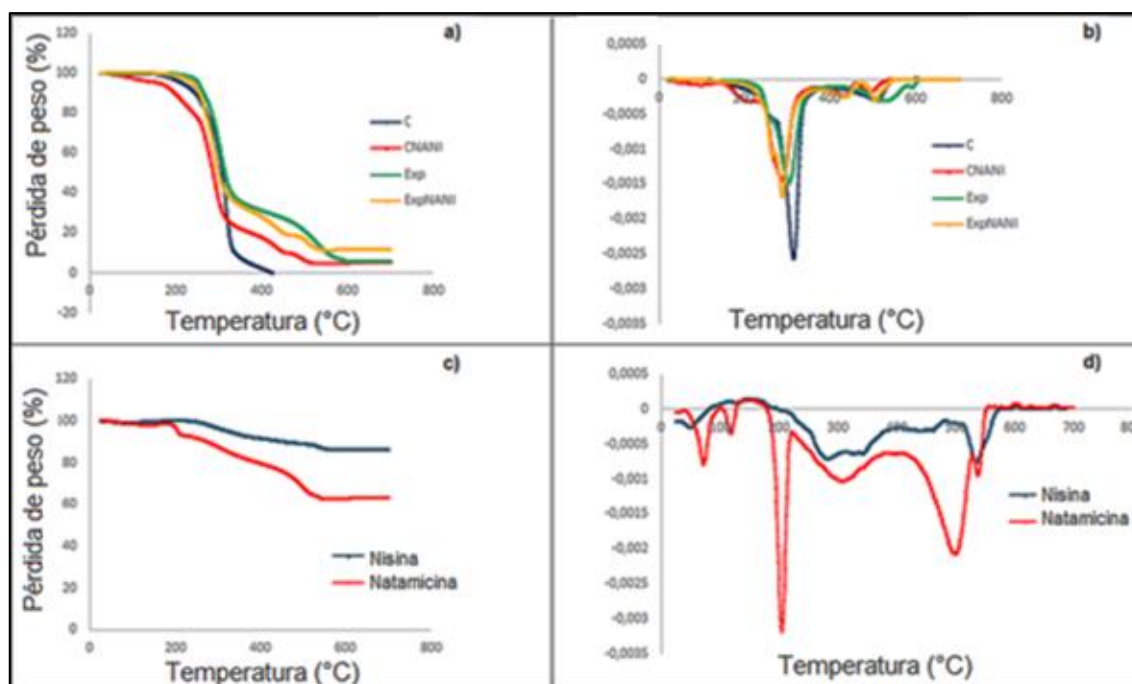


Figura 3.8 - Termogramas y primera derivada por análisis termogravimétrico (TGA) de películas a base de almidón (a y b): control (C), con natamicina y nisina (CNANI), con expeller de soja sonicado (SSE) como relleno (Exp) y con SSE y los antimicrobianos (ExpNANI) y de nisina y natamicina en polvo (c y d).

3.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la **figura 3.9.a, c, e y g** se observan las micrografías de la superficie de las películas, mientras que la **figura 3.9.b, d, f y h** muestran las fracturas. En general, resultaron matrices homogéneas, lisas y sin poros. Las películas control con antimicrobianos (CNANI) presentaron zonas con cristales de natamicina integrados a la matriz (indicados con flecha blanca en la **figura 3.9.c y d**) a diferencia de las películas ExpNANI (con expeller de soja sonicado y los antimicrobianos) que presentó una imagen más integrada sin visualización de los cristales de natamicina (**figura 3.9.g y h**). En esta última, tanto el expeller como los antimicrobianos se unieron a la matriz generando una estructura más homogénea. En particular, las películas Exp (con SSE) presentaron zonas donde se observó el relleno (indicado con flechas negras en la **figura 3.9.e y f**). El expeller de soja prácticamente no se percibe en las imágenes por estar cubierto con la matriz de almidón. Las imágenes observadas son comparables a simple vista con las imágenes obtenidas en el **Capítulo 2 sección 3.2.6** para matrices conteniendo salvado de arroz y/o antimicrobianos, las mínimas diferencias se deben a las características del relleno.

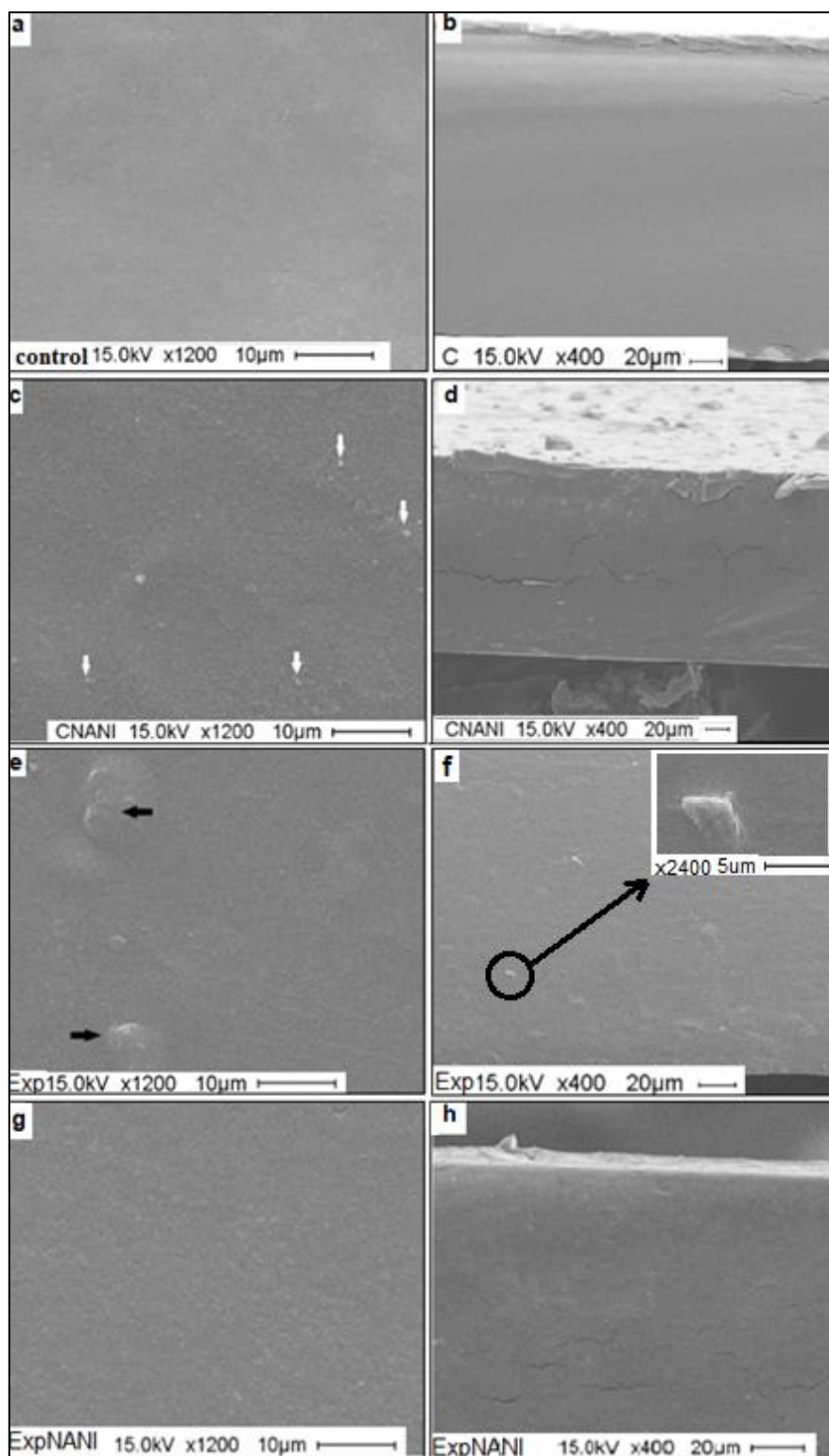


Figura 3.9 - Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las superficies de las películas C (a), CNANI (c), Exp (e) y ExpNANI (g). Imágenes SEM de superficies fracturadas de las películas C (b), CNANI (d), Exp (f) y ExpNANI (h). Las flechas blancas indican los cristales de natamicina y las flechas negras las partículas de SSE en la matriz.

3.11 Biodegradabilidad

El ensayo de biodegradabilidad consiste en simular las condiciones de degradación que se dan en el medio natural, por acción de la microflora presente en el suelo (Stoll y col., 2017). Las imágenes de biodegradabilidad de las películas se muestran en la **Figura 3.10**.

La disgregación puede deberse tanto a la acción de los microorganismos y sus enzimas, como a la solubilización de los compuestos solubles presentes en las películas como consecuencia del agua incorporada (temperatura: 17-19 °C, humedad relativa: 62-65%). En este proceso, las películas se desintegraron casi por completo después del séptimo día. Por observación visual, las películas con SSE mostraron una mayor degradación después de cinco días en comparación con la película CNANI.

Del mismo modo, varios autores han demostrado la biodegradabilidad de películas basadas en diferentes biopolímeros. Stoll y col. (2017) analizaron la biodegradabilidad de película activa de almidón con antocianinas encapsuladas y observaron una pérdida del 96,27% de su peso inicial después de 10 días enterrada en suelo interior. Ochoa-Yepes y col. (2019) demostraron la degradación casi completa de películas a base de almidón con aislado de proteína de lenteja después de 5 semanas bajo compost vegetal.

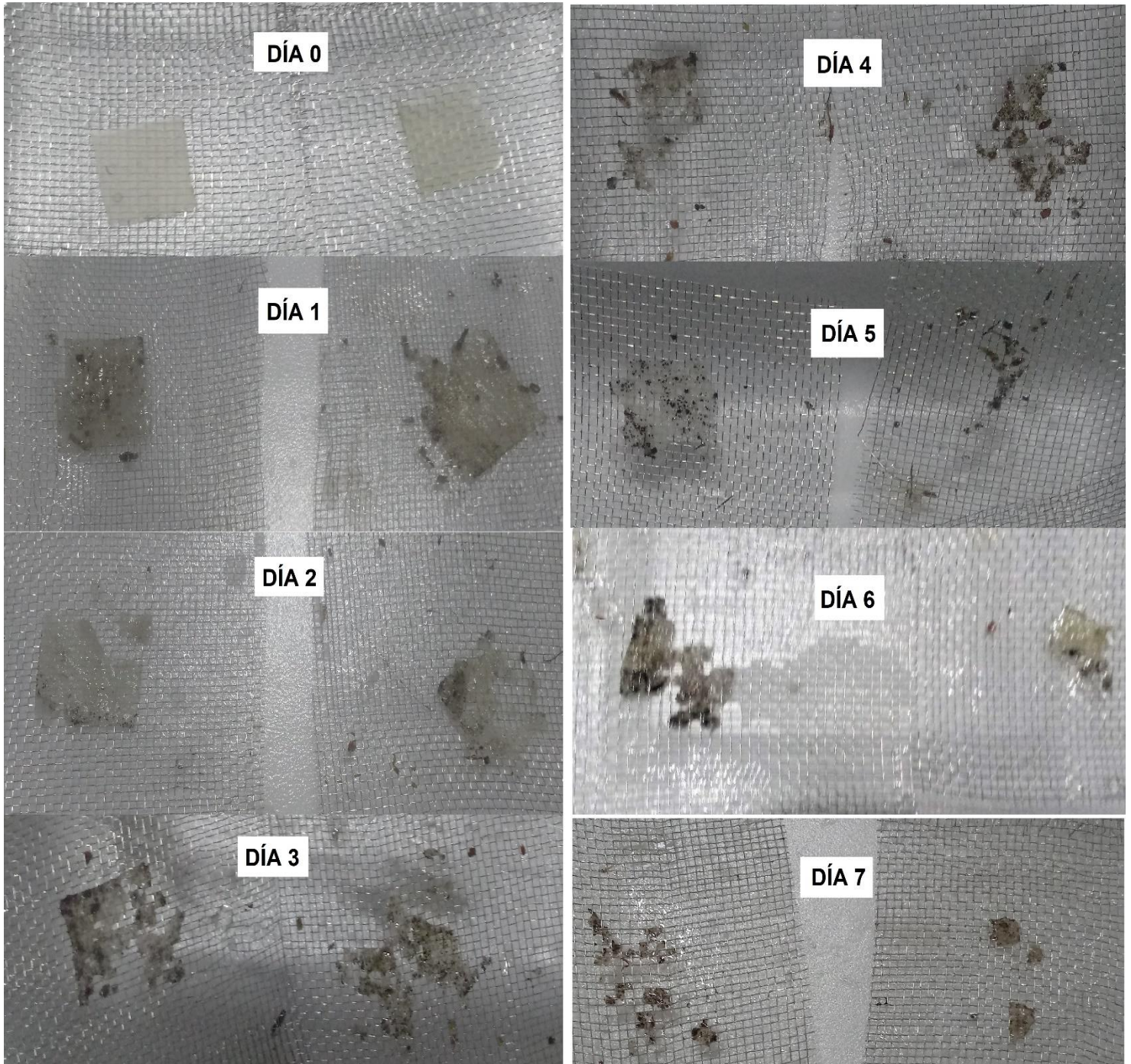


Figura 3.10 - Fotografías de la película control, CNANI (izquierda) y película óptima (ExpNANI) con 0,46 g de expeller de soja sonicado 100 g^{-1} muestra (derecha) después de retirarlas del compost.

3.12 Actividad antimicrobiana de las películas y recubrimientos

3.12.1 Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (*Ensayo del halo*)

Las películas sin antimicrobiano (Exp y C) no presentaron formación de halos de inhibición de *S. cerevisiae* ni *L. innocua*, demostrando que estas películas no tienen propiedades antimicrobianas. Por otro lado, se pudo observar un halo de inhibición interno alrededor de los discos de película óptima ExpNANI y de CNANI, que corresponde al halo de inhibición de *L. innocua* por acción de la nisina ($2,1 \pm 0,1$ cm). Asimismo, se observó un halo externo que corresponde al halo de inhibición de *S. cerevisiae* por acción de la natamicina ($2,7 \pm 0,1$ cm). Por tanto, se pudo demostrar que SSE incorporado en las películas no impide la difusión de natamicina y nisina, permitiendo la formación de halos de inhibición para bacterias y levaduras. En el **capítulo 2 sección 3.3.1** se observaron doble halos similares en películas a base de almidón, reforzadas o no con salvado de arroz, que contenían natamicina y nisina.

3.12.2 Actividad de barrera de las películas sobre queso Port Salut

El ensayo de aplicación de películas sobre queso Port Salut, se realizó con el fin de comparar la eficiencia y capacidad de barrera de las películas comestibles con expeller de soja sonicado (Exp) y con expeller y los antimicrobianos (ExpNANI) en relación con sistemas control (CNANI) y queso sin recubrir frente a una contaminación externa.

En la **figura 3.11.a** se puede observar que las películas ExpNANI y CNANI (con nisina y natamicina) inhibieron en igual magnitud el desarrollo de *L. innocua* (los valores no difieren significativamente, $p > 0,05$). En ambos casos, los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección después de 24 h de almacenamiento. Mientras que la película sin antimicrobianos (Exp) mantuvo niveles entre los 8 y 9 ciclos log (por encima del límite de aceptación) durante el período evaluado. En este sentido, la incorporación de una película con SSE y antimicrobianos al queso, además de contribuir a una mejor conservación, puede otorgar mejores propiedades mecánicas y menor solubilidad a la película.

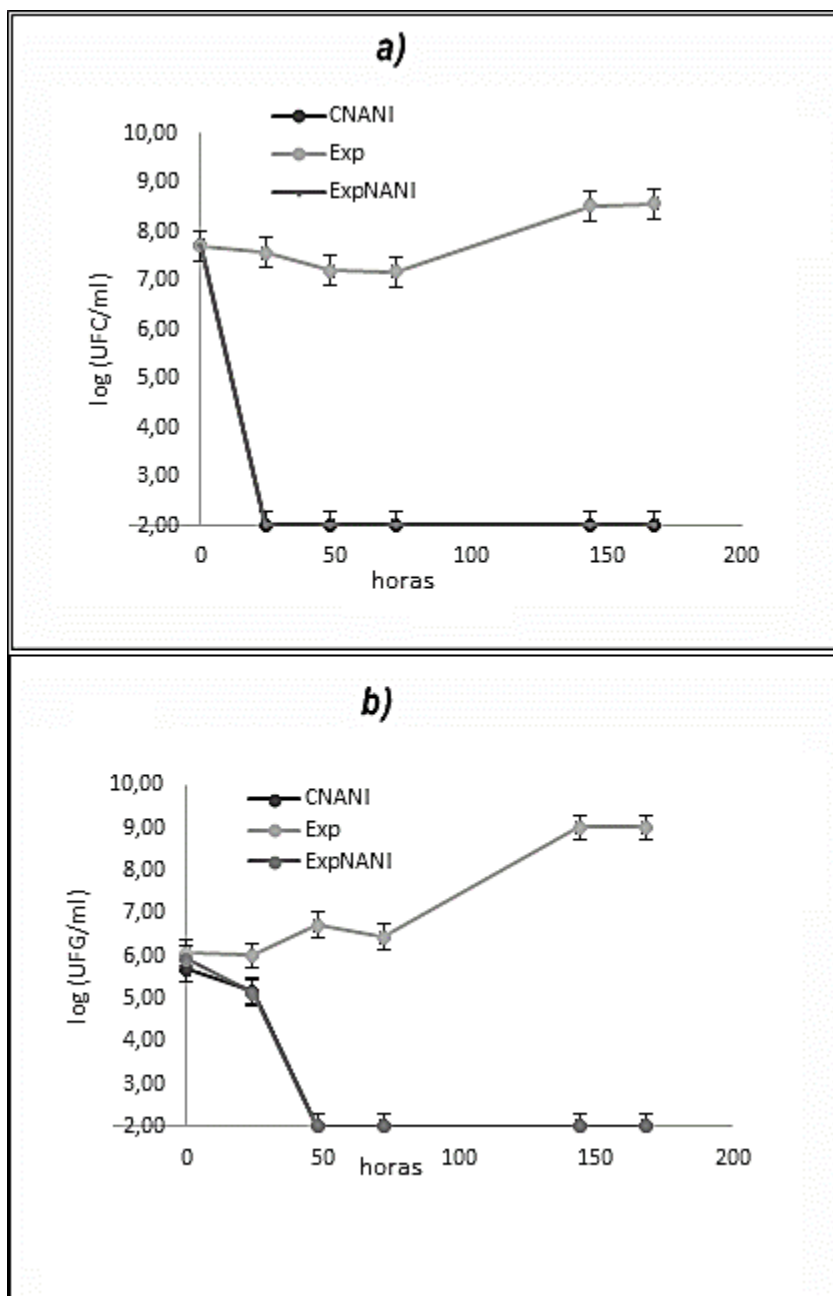


Figura 3.11 - Actividad de barrera antimicrobiana de las películas sobre queso Port Salut. Eficacia de los diferentes tratamientos aplicados en el almacenamiento de queso Port Salut a 12 °C. Películas con natamicina y nisina (CNANI), con expeller de soja sonicado (Exp) y con expeller y antimicrobianos (ExpNANI). Panel a: *L. innocua*. Panel b: *S. cerevisiae*.

De manera similar, en la **figura 3.11.b**, se observa que luego de las 48 h los recuentos de colonias de *S. cerevisiae* se encuentran por debajo del límite de detección para quesos recubiertos con ExpNANI y con CNANI. Las películas inhibieron en igual magnitud el desarrollo de dicho microorganismo (los valores no difieren significativamente, $p > 0,05$). Mientras que los recuentos sobre las películas con Exp aumentaron a lo largo del almacenamiento hasta 9 log (UFC/mL).

Adicionalmente, se observó que todas las películas aplicadas sobre los quesos resultaron útiles como barreras frente a la contaminación realizada. No se observaron crecimientos de los microorganismos en la superficie de los quesos una vez retiradas las películas y realizado los homogenatos correspondientes como se describe en el capítulo anterior. Mientras que al analizar quesos inoculados sin recubrimiento se observó un aumento de los recuentos de *L. innocua* y *S. saccharomyces* a lo largo del almacenamiento sin presentarse inhibición en el desarrollo.

Estos resultados son similares a los observados en las películas con salvado de arroz y antimicrobianos analizadas en el **Capítulo 2 sección 3.3.3**. Es decir, en relación con la actividad antimicrobiana, tanto las películas activas con salvado de arroz (SNANI) como las películas con expeller de soja sonicado (ExpNANI) resultan eficientes frente a una contaminación externa con *S. cerevisiae* y *L. innocua*.

3.12.3 Actividad de barrera de los recubrimientos sobre queso Port Salut

El ensayo de aplicación de recubrimientos sobre queso Port Salut se realizó con el fin de comparar la efectividad y capacidad de barrera de estas coberturas comestibles con expeller de soja sonicado y antimicrobiano en relación con sistemas control y queso sin recubrir (**figura 3.12**). Considerando los resultados obtenidos en el **Capítulo 2 sección 3.3.4** se utilizó nuevamente una concentración 3 veces superior de antimicrobianos respecto a la única utilizada en las formulaciones de las películas.

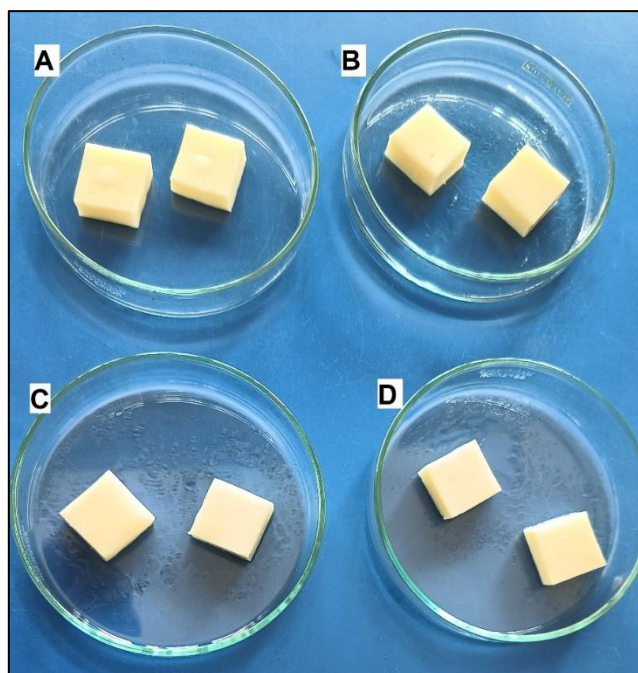


Figura 3.12- Ensayo de barrera en recubrimientos sobre queso Port Salut a 12 °C. A) queso sin recubrir, B) queso recubierto con CNANI (con natamicina y nisina), C) queso recubierto con Exp (con expeller de soja sonicado) y D) queso recubierto con ExpNANI (con expeller y antimicrobianos) inoculados con cultivo mixto de *L. innocua* y *S. cerevisiae*.

En la **figura 3.13.a** se puede observar que los recubrimientos ExpNANI y CNANI (con nisina y natamicina) sobre el queso Port Salut inhibieron en igual magnitud el desarrollo de *L. innocua* (los valores no difieren significativamente, $p > 0,05$). En ambos casos, los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección después de 24 h de almacenamiento y hasta su finalización. Mientras que el recubrimiento sin antimicrobianos (Exp) y el queso sin recubrir mantuvieron niveles alrededor de los 5 ciclos log (por encima del límite de aceptación) en el período evaluado.

De manera similar, en la **figura 3.13.b**, se observa que luego de las 24 y 48 h los recuentos de colonias de *S. cerevisiae* se encuentran por debajo del límite de detección para quesos recubiertos con CNANI y con ExpNANI, respectivamente, manteniendo este valor en todo el período evaluado. Los recubrimientos inhibieron en igual magnitud el desarrollo de dicho microorganismo (los valores no difieren significativamente, $p > 0,05$). Mientras que los recuentos sobre quesos recubiertos con Exp y sin recubrir aumentaron a lo largo del almacenamiento. En este sentido, al aplicar el recubrimiento ExpNANI, además de contribuir a una mejor conservación por acción de los

antimicrobianos presentes, se incorporarían fibra y proteínas como componentes adicionales al alimento.

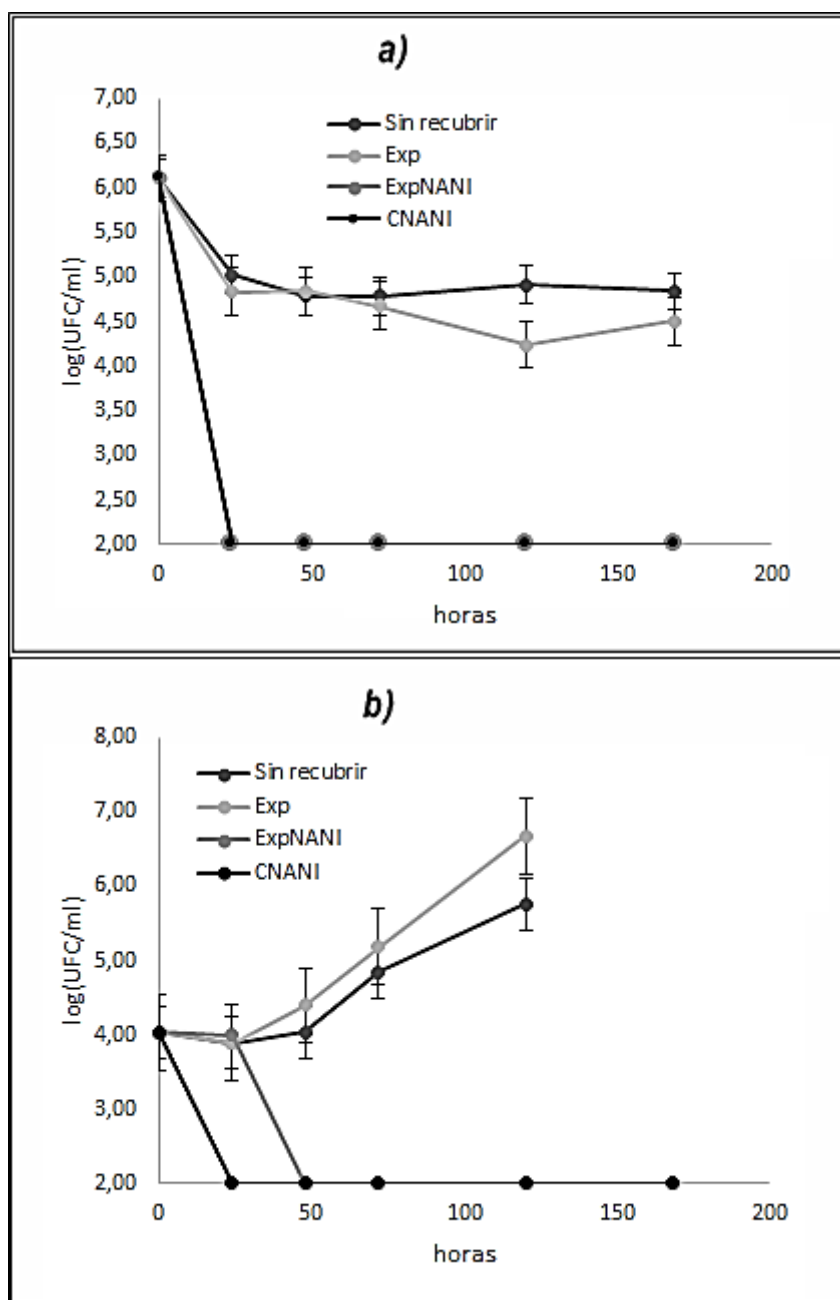


Figura 3.13- Actividad de barrera antimicrobiana de recubrimientos en queso Port Salut. Eficacia de los diferentes tratamientos aplicados en el almacenamiento de queso Port Salut a 12 °C. Recubrimientos con 0,0204 g de natamicina y 0,081 g nisina (CNANI), con 0,46 g de expeller de soja sonicado (Exp) en 100 mL de slurry; y con expeller y antimicrobianos (ExpNANI) y queso sin recubrir. Panel a: *L. innocua*. Panel b: *S. cerevisiae*.

4 Conclusiones

En el presente Capítulo, se muestran los resultados correspondientes al desarrollo y caracterización de películas comestibles a base de almidón de mandioca plastificadas con glicerol, reforzadas con expeller de soja sonicado (SSE) y conteniendo los antimicrobianos naturales natamicina y nisina.

Los resultados de los estudios en las películas sin antimicrobianos revelaron que SSE (en un rango entre 0,2 g y 0,4 g / 100 mL de slurry) tuvo la influencia más importante en la solubilidad en agua (WS) y esfuerzo a la ruptura, produciendo matrices más resistentes. La película con mayor contenido de SSE, 0,4 g / 100 mL de slurry, mostró la WS más baja.

A partir de un diseño central compuesto, se obtuvo una película antimicrobiana con niveles de SSE de 0,46 g / 100 mL de slurry y Gly de 1,4 g / 100 mL de slurry que optimizaron el desempeño mecánico y la solubilidad.

Adicionalmente, se demostró la biodegradabilidad de las películas después de siete días enterradas en compost. Esto resulta de gran interés para su consideración como empaques amigables con el medioambiente dada su alta degradabilidad en poco tiempo.

Los antimicrobianos contenidos en la película formulada con 0,46 g de SSE y 1,4 g de glicerol / 100 mL de slurry se encontraron disponibles y presentaron una acción de barrera antimicrobiana eficaz frente a *L. innocua* y *S. cerevisiae* evaluadas sobre un sistema modelo y queso Port Salut.

Del mismo modo, el recubrimiento diseñado con 0,46 g de SSE / 100 mL de slurry y 1,4 g de glicerol / 100 mL de slurry, permitió la liberación de los antimicrobianos mejorando la estabilidad microbiológica del queso Port Salut.

Estos resultados mostraron las ventajas de incorporar SSE como refuerzo obteniendo mejoras en las propiedades mecánicas y en la solubilidad de las películas, además de un enfoque ecológico para desarrollar matrices biocompuestas que se puedan utilizar como material de envasado activo.

CAPÍTULO 4

Comparación entre técnicas de casteo y termo-compresión en el desarrollo de películas a base de almidón de mandioca conteniendo o no antimicrobianos naturales

El presente capítulo se desarrolló a partir de una estancia de intercambio de investigación en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) - España por una estadía de 3 (tres) meses en el marco de una Beca de Movilidad Académica entre todas las instituciones asociadas a la AUIP. El objetivo del intercambio fue ampliar los conocimientos a través de la aplicación de nuevas tecnologías para la formulación, obtención y caracterización de matrices amiláceas y nuevas metodologías para su caracterización.

El trabajo realizado se centró en el desarrollo, fabricación y caracterización de películas comestibles termoformadas activas a base de almidón, adicionadas con antimicrobianos naturales bajo la dirección de la Dra. María Consuelo González Martínez.

Se formularon y fabricaron distintas matrices a base de almidón de mandioca con agregado o no de nisina y/o natamicina. Luego se realizaron ensayos de caracterización de las películas termoformadas y se las comparó con los mismos sistemas elaborados por casteo mediante ensayos de barrera (permeabilidad al oxígeno y al agua), ensayos mecánicos (evaluación de las propiedades mecánicas por ensayo de tracción), ensayo de determinación de las propiedades térmicas (por calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico), observaciones a través del microscopio electrónico de barrido (FESEM), solubilidad en agua y contenido de humedad. A su vez, se determinó el espesor, el color y la transmitancia a 600 nm de las diferentes películas. Adicionalmente se realizaron ensayos microbiológicos para evaluar la efectividad de las películas activas.

1 Introducción

Las películas biodegradables se pueden obtener a través de dos técnicas diferentes, los procesos húmedo o seco, llamados casteo (casting) y extrusión respectivamente. La técnica de casteo es el método de formación de película más utilizado a pequeña escala. Consiste en la formación de películas a partir de la solución o dispersión de polímeros en agua o agua-etanol, calentamiento con agitación, extensión de la suspensión sobre un molde adecuado y posterior secado para conseguir la evaporación del disolvente. Mientras que la técnica de extrusión y termo-compresión es el método de moldeo más común y simple. Esta técnica utiliza altas temperaturas y fuerzas de corte para ablandar y fundir el polímero, lo que permite la formación de películas cohesivas (de Vargas et. al, 2022). Esta técnica se basa en las propiedades termoplásticas de los polímeros cuando son plastificados con bajo contenido de agua y calentados por encima de su T_g . Este proceso permite preparar la película en un tiempo menor siendo una técnica con mejores aplicaciones industriales que el casteo (Chuaynukul y col., 2018). Las técnicas mencionadas pueden afectar de diferente manera las características de las películas, así como modificar la interacción y organización molecular. Esto podría resultar en diferentes propiedades fisicoquímicas.

Este capítulo provee un informe comparativo sobre el impacto de la termo-compresión y el método de casteo en cuanto a las propiedades fisicoquímica y antimicrobianas de películas a base de almidón conteniendo natamicina y/o nisina.

Objetivos

Los objetivos del presente capítulo fueron:

- ✓ Desarrollar películas comestibles a base de almidón de mandioca conteniendo antimicrobianos naturales mediante la técnica de termo-compresión.
- ✓ Estudiar las propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímica (color, permeabilidad al vapor de agua y el oxígeno y solubilidad en agua) y térmicas de las películas comestibles desarrolladas por termo-compresión.
- ✓ Comparar las características de las películas elaboradas por las técnicas de termo-compresión y casteo.
- ✓ Estudiar la actividad antimicrobiana de las películas comestibles termoformadas, en sistemas modelos y queso Port Salut, a fin de mejorar su estabilidad microbiológica.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Se utilizaron el almidón de mandioca, el glicerol, la natamicina y la nisina detallados en el **Capítulo 2 sección 2.1**. Los productos químicos fueron de grado analítico.

2.2 Preparación de la película

Se usaron dos métodos de procesamiento, casteo (C) de las soluciones acuosas biopoliméricas y mezcla por fusión seguida de moldeo por termo-compresión (T), para obtener las películas a base de almidón de acuerdo con la **Tabla 4.1**, donde la composición se expresa como fracción de masa nominal (**ecuación 4.1**).

$$X_i = \frac{\text{gramos de } i}{\text{gramos totales}} \quad (4.1)$$

Siendo i , cada componente.

Tabla 4.1- Fracción de masa nominal de los componentes de las películas

Sistemas	$X_{\text{almidón}}$	X_{glicerol}	X_{nisina}	$X_{\text{natamicina}}$
C	0,71000	0,29000	0	0
CNA	0,71359	0,28544	0	0,00097
CNI	0,71154	0,28462	0,00384	0
CNANI	0,71085	0,28434	0,00384	0,00097
Tcontrol	0,71000	0,29000	0	0
TNA	0,71359	0,28544	0	0,00097
TNI	0,71154	0,28462	0,00384	0
TNANI	0,71085	0,28434	0,00384	0,00097

2.2.1 Películas obtenidas por casteo

Se prepararon diferentes formulaciones de acuerdo con los procedimientos descritos en el **Capítulo 2 sección 2.7**. En este caso, la solución formadora de película se extendió uniformemente sobre un molde de silicona (22 cm x 24 cm) obteniéndose $0,24 \pm 0,03$ mm de espesor final. Se usaron películas plastificadas sin compuestos activos

como controles. Las diferentes formulaciones de película y la relación de masa de los componentes respectivos se muestran en la **Tabla 4.1**.

2.2.2 Películas obtenidas por termo-compresión

Las películas termo-procesadas se obtuvieron mediante el moldeo por compresión de gránulos utilizando una prensa de placa caliente (Modelo LP20, Labtech Engineering, Tailandia) como se detalla en el diagrama de la **Figura 4.1** y como se esquematizó en el **Capítulo 1 sección 1.5**. En una primera etapa, se obtuvieron los pellets de almidón termoplástico mezclando en estado fundido los diferentes componentes utilizando un mezclador interno (HAAKE™ PolyLab™ QC, Thermo Fisher Scientific, Alemania) a 130 °C y 50 rpm, durante 10 min. En todos los casos se usó 40% en peso de glicerol respecto al almidón y se adicionaron a la mezcla los compuestos activos al 0.54% y 0.136%, nisina y natamicina respectivamente. Los pellets se molieron en frío en un molino discontinuo (Modelo M20, IKA, Alemania) y las partículas pre-acondionadas (al 53 % de HR y 25 °C durante 7 días) se moldearon por compresión con un paso de precalentamiento de 1 min a 160 °C, seguido de 2 min termo-compresión a 50 bar y 6 min a 100 bar. Posteriormente, se aplicó un ciclo de enfriamiento de 3 min para reducir la temperatura a aproximadamente 70 °C. Se obtuvieron películas plastificadas sin compuestos activos como controles. Las diferentes formulaciones de película y la relación de masa de los componentes respectivos se muestran en la **Tabla 4.1**.

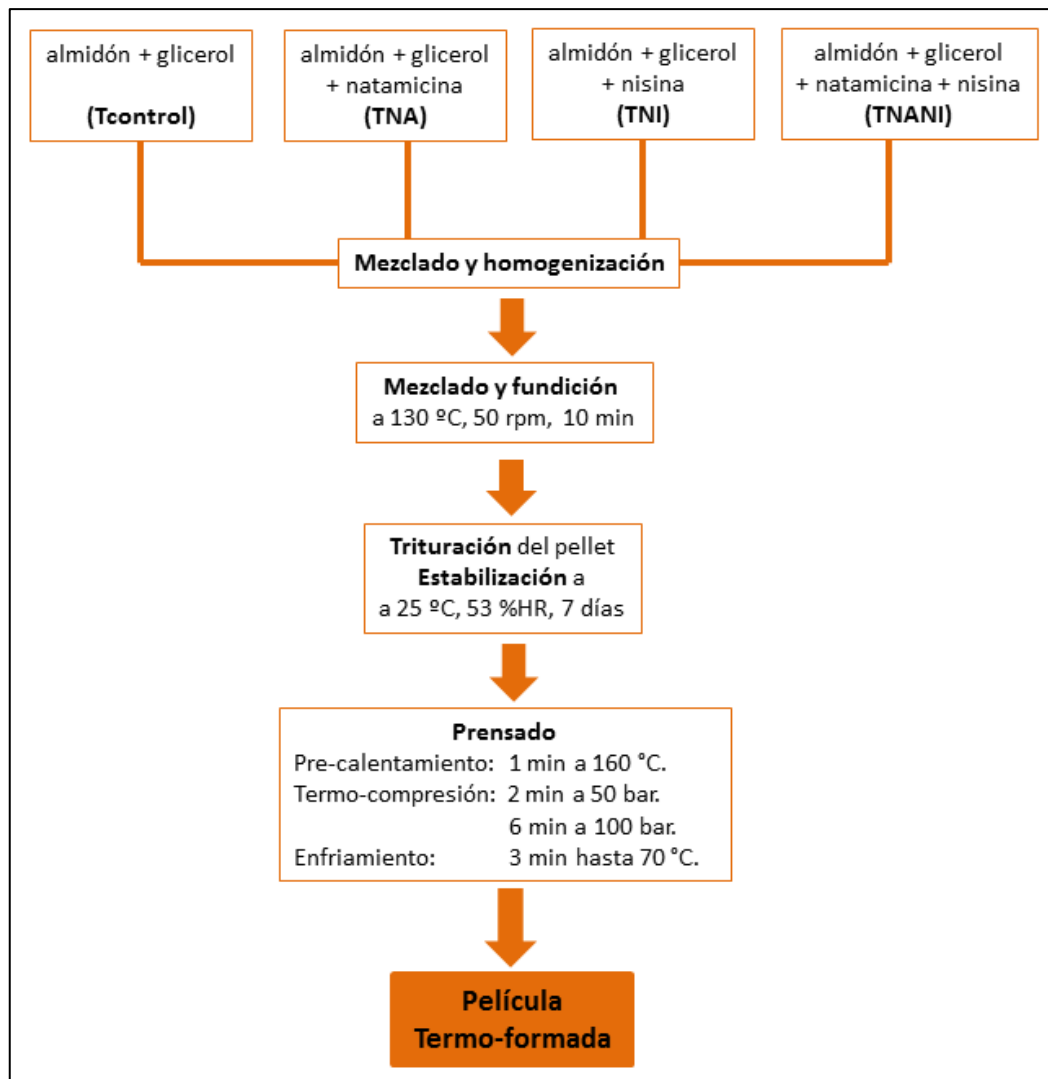


Figura 4.1 – Diagrama de flujo Elaboración de películas termo-formadas.

2.3 Caracterización fisicoquímica de las películas formuladas

2.3.1 Propiedades mecánicas: ensayo de tracción

El ensayo de tracción se realizó utilizando una máquina de ensayo Universal (Stable Micro System TA, XT plus, Haslemere, Inglaterra) siguiendo el método estándar ASTM D882-02 (ASTM, 2002). Anteriormente, el espesor de las muestras se midió con un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón), en tres posiciones diferentes. Muestras de película de prueba equilibradas (60 mm x 6 mm) se montaron en las mordazas de extensión de película con una separación inicial de 20 mm y se estiraron a 50 mm/min hasta ruptura. El módulo de Young (MY), la tensión de tracción (σ_b en MPa) y la deformación en el punto de ruptura (ϵ_b en %) se calcularon a partir de las curvas de tensión frente a deformación de Hencky, según Wang y col. (2019) **ecuación 4.1** y **4.2** respectivamente. Las mediciones se realizaron en diez muestras de cada tratamiento.

$$\sigma_b = F_t \frac{(d_0 + d_t)}{V_0} \quad (4.2)$$

$$\varepsilon_b = \ln \left(\frac{d_0 + d_t}{d_0} \right) \quad (4.3)$$

donde F_t es la fuerza aplicada en el tiempo t , d_0 es la distancia inicial (separación inicial entre mordazas), d_t es la distancia dada en el tiempo t y V_0 es el volumen inicial de la película.

2.3.2 Color y transmitancia interna (T_i)

Las propiedades ópticas se analizaron utilizando un espectrocolorímetro Minolta (Modelo CM-3600d, Tokio, Japón). Los espectros de reflexión (400–700 nm, ancho de banda de 10 nm, componente especular incluido) de las películas apoyadas en placa blanca y negra se midieron por triplicado en seis puntos de la misma muestra de película. La transparencia se midió a través de la transmitancia interna (T_i), aplicando la teoría de Kubelka-Munk de la dispersión múltiple del espectro de reflexión. Las coordenadas de color CIELab (iluminante D65 y observador 10°) se obtuvieron a partir de la reflectancia de una capa infinitamente gruesa del material según Hutchings (1999). La T_i , a^* (rojo-verdoso), b^* (amarillo-azulado) y la diferencia de color total se determinaron acorde a lo mencionado en el **Capítulo 1 sección 1.7.2**.

2.3.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO)

La PVA se determinó gravimétricamente por triplicado para cada película a 25 °C y 53-100 % de gradiente de HR usando una modificación de la norma E96/E95M-05 (ASTM, 2003) para películas hidrofílicas. Las películas se cortaron en círculos de 3,5 cm de diámetro y se montaron en celdas de permeabilidad Payne (Elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica) con 5 mL de agua destilada (100% HR). Estas copas se colocaron en desecadores pre-equilibrados que contenían una solución de nitrato de magnesio sobresaturada (53 % de HR). Cada copa se pesó periódicamente durante 48 h utilizando una balanza analítica con una precisión de $\pm 0,00001$ g. PVA se calculó según lo descrito por Cano y col. (2014).

La permeabilidad al oxígeno (PO) de muestras de películas (50 cm²) equilibradas a 53% de HR se midió utilizando el sistema Oxy-sense (Modelo 8101e, S Stech, Illinois)

a 25 °C y 53% de HR. La PO se calculó según lo descrito en el **Capítulo 1 sección 1.7.4**. El espesor de la película se midió con un micrómetro electrónico digital (Palmer, COMECTA, Barcelona, España) con una precisión de 0,001 mm en cinco posiciones aleatorias.

2.3.4 Solubilidad en agua y humedad

El contenido de humedad de las películas previamente acondicionadas (53% HR y 20 °C) se determinó gravimétricamente después de secar las películas a 60 °C durante 48 h (JP Selecta S.A., Barcelona, España) y, posteriormente, se transfirieron a un desecador con P₂O₅ hasta alcanzar un peso constante.

La solubilidad en agua (WS) se evaluó en muestras de película seca (2 cm x 2 cm) según lo descrito por Talón y col. (2019). Estas muestras se colocaron dentro de una malla, se pesaron y se colocaron en un crisol con agua destilada (30 mL) a 25 °C durante 24 h. Las mallas con la película remanente se secaron en estufa (J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España) a 60 °C durante 48 h y, posteriormente, se transfirieron a un desecador con P₂O₅ hasta peso constante. La prueba de solubilidad se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como g de película solubilizada/100 g de película inicial.

2.3.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de las películas se realizaron y evaluaron de acuerdo con la metodología descrita en el **Capítulo 2 sección 2.5**.

2.3.6 Propiedades térmicas

El comportamiento térmico de las películas secas se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA) utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC 1 StareSystem, Mettler-Toledo, Inc., Suiza) y un analizador termogravimétrico (TGA/SDTA 851e, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Suiza) respectivamente. Para los análisis de TGA, las muestras se calentaron en cápsulas de alúmina de 25 °C a 700 °C a 10 °C/min. Las curvas de DSC se obtuvieron aplicando un programa de calentamiento similar al descrito en el **Capítulo 3 sección 2.9**. Se usó una cápsula vacía como referencia. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.3.7 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

El análisis de la microestructura de las secciones transversales de la película se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) (modelo ZEISS ULTRA 55, Zeiss, Alemania) con un voltaje de aceleración de 1,5 kV. Las muestras de película seca fueron previamente crio-fracturadas por inmersión en nitrógeno líquido y se metalizaron aplicando una cobertura de platino.

2.4 Actividad antimicrobiana de las películas

2.4.1 Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (Ensayo del halo)

La eficacia antimicrobiana de las películas se analizó por triplicado mediante la prueba de difusión en agar frente a una bacteria Gram positiva (*Listeria innocua*, CIP 80.11) y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171) de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, España), siendo ambos microorganismos comunes en el deterioro de los alimentos. Para ello, se extendieron suspensiones de cultivo de microorganismos (1 mL, 10⁶ CFU/mL) sobre una placa de agar PCA. Posteriormente, se colocaron los discos de las películas sobre las placas sembradas. Las placas se almacenaron a 4 °C durante 48 h y luego se incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Finalizado este período, la actividad antimicrobiana de las películas de almidón se evaluó midiendo el diámetro de la zona clara (zona de inhibición) que rodea los discos de películas de almidón. Las películas sin antimicrobianos se usaron como controles. Adicionalmente, a fin de profundizar el estudio de la actividad antimicrobiana frente a levaduras deteriorativas, se analizó la eficacia antimicrobiana de las películas adicionadas con natamicina mediante la prueba de difusión en disco frente a *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii*.

2.4.2 Actividad de barrera antimicrobiana y difusión de la natamicina en películas sobre queso Port Salut

La acción de barrera y la difusión de la natamicina presente en películas activas aplicadas sobre queso Port Salut se evaluó según lo detallado en el **Capítulo 2 secciones 2.8.2 y 2.8.3** respectivamente. Se utilizaron como microorganismos las levaduras deteriorativas: *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Zygosaccharomyces bailii* en cultivo simple.

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó según lo detallado en el **Capítulo 2** sección **2.10**.

3. Resultados y discusión

Se estudiaron comparativamente películas obtenidas por diferentes métodos de fabricación (métodos de casteo de la solución formadora y de termo-compresión). Las películas obtenidas por casteo tuvieron un espesor promedio de $228 \pm 15 \mu\text{m}$ siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) que los medidos para las películas obtenidas por termo-compresión, $164 \pm 9 \mu\text{m}$.

3.1 Caracterización fisicoquímica de películas

3.1.1 Propiedades mecánicas

En general, todas las películas (después del acondicionamiento a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 53% H.R.) mostraron un comportamiento de deformación dúctil, fueron flexibles y fáciles de manipular. Bajo tensión de tracción uniaxial, mostraron comportamientos de deformación plástica (ejemplo en **Figura 4.2**). Los resultados de Esfuerzo a la ruptura: σ_b , elongación máxima: ϵ_b y Módulo de Young: MY de las películas estudiadas se muestran en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2 – Propiedades mecánicas de películas a base de almidón elaboradas por casteo y termo-compresión. Sistemas control (C y Tcontrol), que contienen nisina (CNI y TNI), que contienen natamicina (CNA y TNA) y que contienen nisina y natamicina (CNANI y TNANI): Esfuerzo a la ruptura: σ_b , deformación a la ruptura: ϵ_b y módulo de Young: MY.

Sistemas	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)	MY (MPa)
C	7 ± 1 ^{Cb}	76 ± 4 ^{Ba}	15 ± 1 Bb
CNA	$3,8 \pm 0,6$ ^{Bb}	55 ± 9 ^{Aa}	13 ± 1 Bb
CNI	$2,5 \pm 0,4$ ^{Ab}	119 ± 8 ^{Ca}	1.2 ± 0.2 Aa
CNANI	$3,3 \pm 0,4$ ^{Ab}	127 ± 8 ^{Cb}	1.0 ± 0.1 Aa
Tcontrol	$2,4 \pm 0,7$ ^{Ba}	114 ± 9 ^{Bb}	0.6 ± 0.1 Aa
TNA	$2,7 \pm 0,8$ ^{Ba}	114 ± 8 ^{Bb}	0.8 ± 0.2 Aa
TNI	$1,2 \pm 0,4$ ^{Aa}	129 ± 2 ^{Cb}	1.6 ± 0.6 Ba
TNANI	$2,5 \pm 0,8$ ^{Ba}	75 ± 8 ^{Aa}	1.4 ± 0.1 Ba

Se reportan la media y la desviación estándar (n=3). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas dentro de una técnica. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre técnicas dentro del mismo tipo de sistema.

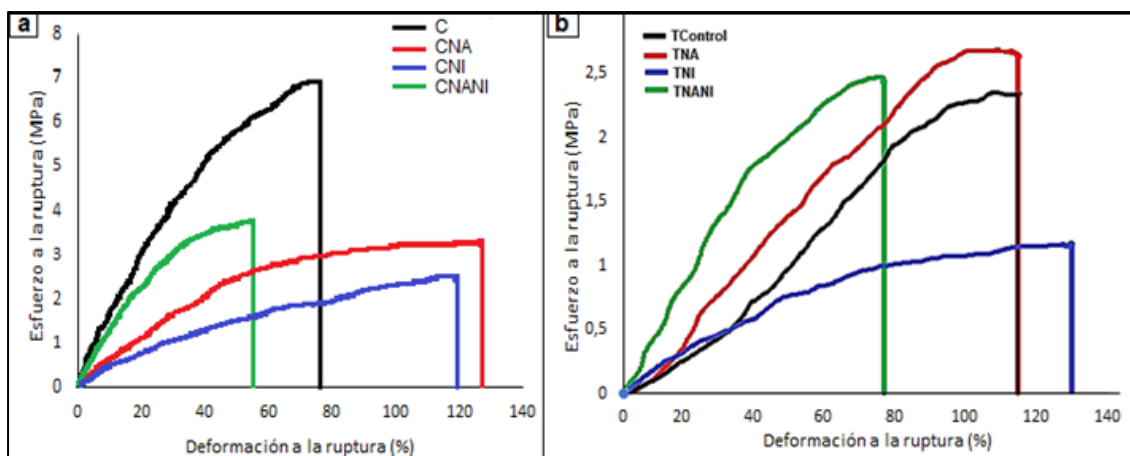


Figura 4.2- Ejemplos de las curvas de tracción de películas elaboradas por a) casteo y b) termo-compresión.

Las propiedades de tracción de las películas de almidón dependieron ($p < 0,05$) del método utilizado para procesar el material, independientemente de la presencia de los antimicrobianos. Las películas obtenidas por el método de casteo fueron más resistentes (mayor resistencia a la tracción), menos deformables (menor ϵ_b %) y menos rígidas (menores valores de MY) que las películas termo-procesadas. Estas diferencias pueden explicarse por la diferente disposición de las cadenas poliméricas, que depende del tipo de procesamiento: durante el proceso de casteo, las cadenas poliméricas pueden desplegarse y orientarse a lo largo de la etapa de secado, lo que da lugar a una red tridimensional más ordenada, que mejora el deslizamiento de las cadenas durante el estiramiento y favorece la resistencia de las películas.

La Fuente y col. (2022) observaron una menor resistencia a la tracción en películas a base de almidón de yuca obtenidas por extrusión en comparación con las películas obtenidas por casteo ($1,13 \pm 0,11$ MPa y $1,79 \pm 0,28$ MPa, respectivamente). De la misma manera, de Oliveira y col. (2021), informaron que las películas de pectina con alto contenido de metoxilo elaboradas por casteo mostraron valores más altos de σ_b y ϵ_b que las películas generadas por la técnica de extrusión. Por el contrario, Ochoa-Yepes y col. (2019), quienes evaluaron las propiedades mecánicas en películas de almidón de yuca obtenidas por casteo y por extrusión/termo-compresión, observaron que los valores de MY y σ_b eran más altos y los valores de ϵ_b eran más bajos en el proceso de extrusión/termo-compresión en comparación con el proceso de casteo. Este comportamiento se atribuyó a la disminución del contenido de agua de las películas

(menor plastificación) por la técnica de termo-compresión, mientras que en el casteo se mantiene una mayor cantidad de moléculas de agua asociada al almidón.

Considerando otro tipo de biopolímeros, Chuaynukul y col. (2018) informaron que las películas de gelatina bovina y de pescado elaboradas por casteo eran más fuertes que las películas desarrolladas por técnica de termo-compresión. Estos autores propusieron que la diferencia en el comportamiento de tracción podría deberse a las diferencias en las características moleculares y las interacciones entre las cadenas poliméricas en la matriz de la película. Estos resultados sugirieron que, mediante la técnica de casteo, la red tridimensional generada era más fuerte que la matriz termoformada.

El efecto plastificante de la nisina se observó en las películas obtenidas por casteo (CNI y CNANI), con valores de elongación superiores al Control. Por lo demás, este efecto no se manifestó en las películas termoformadas. Probablemente, esta quede atrapada en la estructura o afectada por el proceso y esto hace que no ejerza el efecto plastificante observado en el caso de casteo.

En las películas obtenidas por casteo, la incorporación de natamicina (CNA) disminuyó significativamente la tensión y la elongación hasta ruptura y aumentó el módulo elástico ($p < 0,05$). Este efecto concuerda con la presencia de cristales de natamicina lo suficientemente grandes como para interrumpir la red de almidón polimérico, debilitando así su resistencia mecánica y aumentando la rigidez de la matriz. En cuanto a las películas CNI y CNANI, en las que no se detectaron cristales, los antimicrobianos actuaron como plastificantes, por lo que se obtuvo un aumento de la deformación de las películas (E%). Ollé Resa y col. (2013) estudiaron películas a base de almidón obtenidas por casteo con y sin natamicina. Observaron que las películas sin natamicina presentaron mayores valores de esfuerzo a la ruptura y Módulo de Young que las películas con el antimicrobiano. Ellos indicaron que probablemente la presencia del antimicrobiano produce una red menos organizada. Al mismo tiempo, Basch y col. (2013) observaron un comportamiento similar cuando estudiaron películas casteadas a base de almidón y HPMC conteniendo nisina y/o sorbato de potasio.

Por otro lado, la presencia de antimicrobianos en las películas termoformadas tuvo un impacto menor, afectando únicamente al módulo de Young de las películas ($p < 0,05$) cuando se incorporó nisina (TNI, TNANI), observándose un aumento del 100%. Estos resultados apuntan a una mejor compatibilización de los antimicrobianos en la matriz de almidón cuando se utiliza la mezcla fundida y el moldeo por compresión en caliente para preparar las películas.

Todas las películas de almidón con o sin antimicrobianos mostraron un comportamiento elástico típico en la región inicial donde se determinó el módulo de Young. En particular, las películas termoformadas mostraron valores más altos que las películas obtenidas por casteo, lo que indicó una mayor rigidez de la película.

3.1.2 Color y Transmitancia interna (T_i)

En la **Figura 4.3.a** pueden observarse los pellets correspondientes a los distintos sistemas que luego se utilizaron para obtener las películas por termo-compresión. En general, observando a simple vista, las películas obtenidas por casteo resultaron ligeramente más transparentes mientras que las obtenidas por termo-compresión fueron más amarillas (**Figura 4.3.c y 4.3.b** respectivamente).

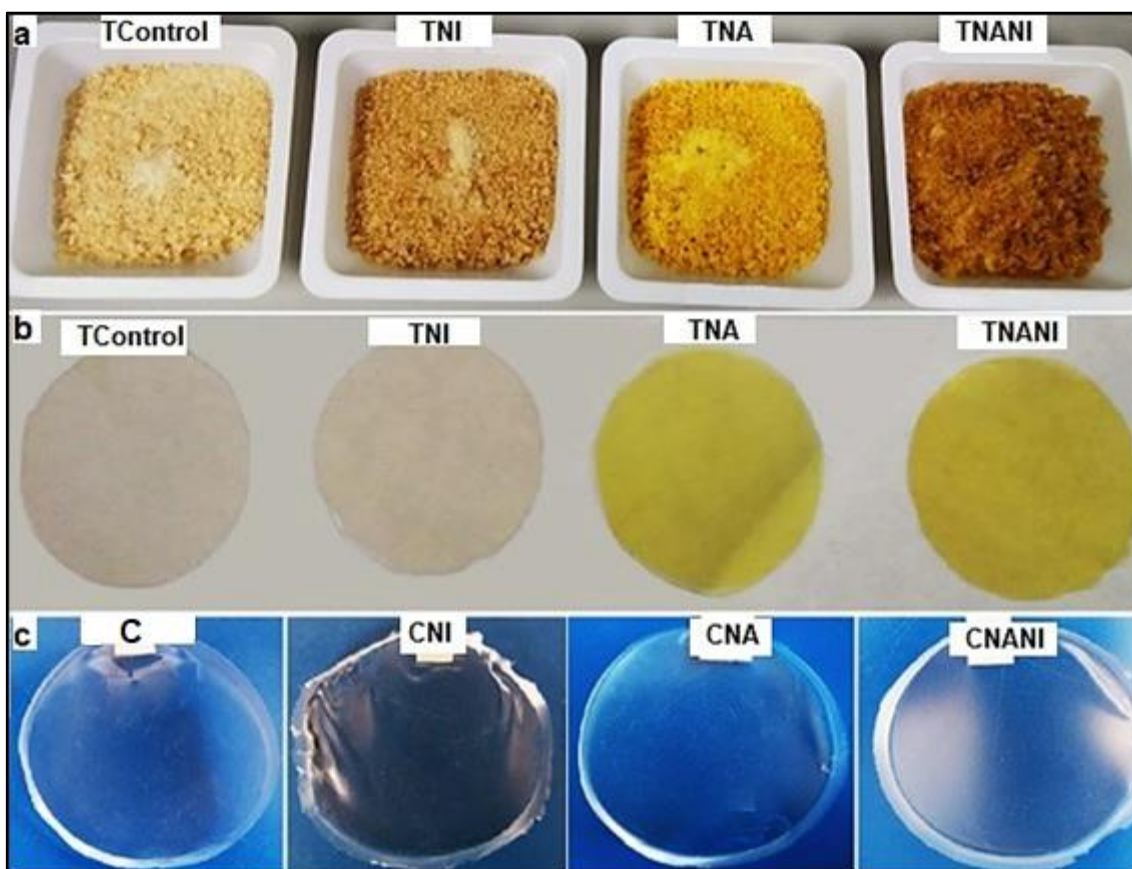


Figura 4.3 – Fotografías de los pellets (a) y de las películas elaboradas por termo-compresión (b) y por casteo (c).

Los parámetros de color de las películas se muestran en la **Tabla 4.3**. Los parámetros L^* , a^* , b^* revelaron el efecto de la presencia de antimicrobianos y la técnica utilizada en el color presentando diferencias significativas. En particular, la luminosidad, L^* , fue

mayor para las películas C y CNA en relación con Tcontrol (películas más oscuras). Asimismo, este parámetro disminuyó con la incorporación de antimicrobianos en CNI, CNANI, TNI, TNA y TNANI. La coordenada de color a^* es positiva para todos los sistemas y aumentó con la adición de nisina (películas con una coloración rojiza muy leve) independientemente de la técnica de fabricación. Por otro lado, se observó que la incorporación de nisina afectó el parámetro b^* en las películas obtenidas por casteo, mientras que en las películas obtenidas por termo-compresión el estuvo determinado principalmente por la incorporación de natamicina y nisina (películas ligeramente más amarillentas). En pruebas preliminares, se observó oscurecimiento de una solución de natamicina cuando se expuso a altas temperaturas como las necesarias en el procesamiento por termo-compresión. Estos resultados observados en las películas se debieron probablemente a las reacciones de oxidación y desestabilización de la natamicina y a las reacciones de caramelización del almidón nativo, debido a las altas temperaturas y la presión utilizadas en técnica de termo-compresión (Freitas y col., 2021). En consecuencia, se observó un aumento significativo en el valor de ΔE debido a la incorporación de los antimicrobianos (en CNI, CNANI, TNA y TNANI), representado principalmente por un aumento en b^* . Por el contrario, Chakravartula y col. (2020) informaron que las películas activas de almidón de yuca/quitosano con natamicina tenían mayor luminosidad, menor a^* y mayor b^* en presencia de esta.

Las películas evaluadas en la presente investigación exhibieron valores altos de T_i , cercanos a 1, en todo el rango de longitud de onda (Menzel y col., 2019). Se observó que la presencia de antimicrobianos disminuyó la transmitancia para ambas técnicas, pero superando los 0,72 que corresponden a una gran homogeneidad y, por tanto, transparencia. En el mismo sentido, Wang y col. (2019) informaron que la presencia de natamicina en películas a base de agar y gelatina disminuyó su transmitancia.

El ángulo de hue de las películas casteadas disminuyó en presencia de nisina mientras que aumentó en presencia de natamicina en películas por termo-compresión. A su vez, el Chroma aumentó en presencia de nisina en películas obtenidas por casteo y en presencia de natamicina en películas obtenidas por termo-compresión. En general, la nisina modula los cambios de color por casteo, mientras que natamicina lo hace en termo-compresión. Este cambio de color podría derivarse de la oxidación parcial de la natamicina, dando lugar a un compuesto amarillento (Meena y col., 2021; Teixeira, y col., 2019). Esto también se reflejó en los valores de ΔE , que fueron, en general, mayores en las películas termoformadas.

Es de destacar que la aceptabilidad del consumidor puede estar influenciada por el color del empaque. Si bien la transparencia del material de empaque es un parámetro valioso, las películas con color pueden proteger mejor los productos contra los efectos negativos de la luz.

Tabla 4.3: Parámetros de color de películas a base de almidón obtenidas por casteo y por termo-compresión. Sistemas de control (C y Tcontrol), que contienen nisina (CNI y TNI), que contienen natamicina (CNA y TNA) y que contienen nisina y natamicina (CNANI y TNANI).

sistemas	Transmitancia						ΔE
	L*	a*	b*	(Ti)	hue	chroma	
C	78 ± 2 ^{Ba}	0,3 ± 0,1 ^{Aa}	8,7 ± 0,4 ^{Aa}	0,84 ± 0,01 ^{Ba}	88 ± 1 ^{Cb}	8,7 ± 0,4 ^{Aa}	---
CAN	80 ± 2 ^{Bb}	0,3 ± 0,2 ^{Aa}	8 ± 2 ^{Aa}	0,85 ± 0,01 ^{Ba}	88 ± 1 ^{Ca}	8 ± 2 ^{Aa}	3 ± 1 ^A
CNI	67 ± 1 ^{Aa}	3,3 ± 0,1 ^{Bb}	14,1 ± 0,3 ^{Ba}	0,80 ± 0,01 ^{Aa}	76,7 ± 0,7 ^{Aa}	14,5 ± 0,2 ^{Ba}	12 ± 1 ^B
CNANI	69 ± 2 ^{Aa}	3,0 ± 0,4 ^{Ba}	14,7 ± 0,6 ^{Ba}	0,808 ± 0,005 ^{Aa}	78 ± 1 ^{Ba}	18,4 ± 0,4 ^{Ba}	11 ± 2 ^B
Tcontrol	75,9 ± 0,4 ^{Da}	0,3 ± 0,1 ^{Aa}	13,8 ± 0,5 ^{Ab}	0,854 ± 0,002 ^{Cb}	80,5 ± 0,3 ^{Aa}	14,0 ± 0,5 ^{Ab}	---
TNA	75 ± 1 ^{Ca}	0,7 ± 0,4 ^{Ab}	29 ± 2 ^{Cb}	0,854 ± 0,003 ^{Ca}	89 ± 1 ^{Ca}	29 ± 2 ^{Cb}	16 ± 2 ^B
TNI	73,5 ± 0,8 ^{Bb}	2,5 ± 0,3 ^{Ba}	16,0 ± 0,9 ^{Bb}	0,847 ± 0,002 ^{Bb}	81,3 ± 0,8 ^{Ab}	16,2 ± 0,9 ^{Bb}	3,4 ± 0,7 ^A
TNANI	69 ± 1 ^{Aa}	2,8 ± 0,2 ^{Ca}	28 ± 1 ^{Cb}	0,830 ± 0,004 ^{Ab}	84,3 ± 0,3 ^{Bb}	28 ± 1 ^{Cb}	15,8 ± 0,5 ^B

Se reportan la media y la desviación estándar (n=18). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas dentro de una misma técnica. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre técnicas dentro del mismo tipo de sistema.

3.1.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) y permeabilidad al oxígeno (PO)

Los resultados de PVA se muestran en la **Tabla 4.4**. Se observó que no hubo diferencias significativas entre todas las películas analizadas (obtenidas por casteo y por termo-compresión). El valor promedio de PVA fue $(2,3 \pm 0,8) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ el cual estuvo en concordancia con lo informado en el **Capítulo 2 sección 3.2.3**. Asimismo, Freitas y col. (2021) reportaron valores entre $(1,5 \text{ y } 1,8) \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ a 25 °C en películas de almidón elaboradas por termo-compresión considerando un gradiente de 53 a 100% de humedad relativa.

Por otro lado, los valores de permeabilidad al oxígeno se muestran en la **Tabla 4.4**. En general, las películas obtenidas por casteo fueron significativamente más permeables al oxígeno que las películas obtenidas por termo-compresión con valores entre $(12 - 22) \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{m.s.Pa}$ versus $(3,6 - 6,3) \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{m.s.Pa}$. Esto puede deberse al tipo de procesamiento realizado en las películas obtenidas por casteo. Las propiedades de transporte de masa de los polímeros están influenciadas por dos factores principales: la fuerza con la que las cadenas poliméricas están unidas y la cantidad de volumen libre que existe entre las cadenas (Miller y Krochta, 1997). Así, aunque se esperaban mejores propiedades de barrera en las películas casteadas debido a que tendrían un mejor empaquetamiento de cadenas orientadas que limitan la difusión molecular, pareciera que este efecto se ve dificultado por su mayor contenido de agua en comparación con las películas termo-comprimidas, promoviendo un mayor volumen libre de las cadenas poliméricas hidrofílicas y favoreciendo la difusión y permeabilidad del oxígeno (Hernández-García y col., 2021). La presencia de los antimicrobianos incrementó los valores de PO de las películas, siendo esto significativo ($p < 0,05$) en las películas que incorporaban ambos antimicrobianos (CNANI, TNANI). Posiblemente, la interacción de los antimicrobianos con el almidón pudo haber generado una red con reducida resistencia al paso de oxígeno. Esto podría relacionarse con una menor cohesividad de la matriz polimérica (menos empaquetada) al incorporar estos antimicrobianos. Entre las películas activas, los valores de PO de las películas cargadas con nisina fueron siempre inferiores a los de las películas cargadas con natamicina debido a su estructura más lineal (no anular) y a su naturaleza más polar, lo que podría promover una mayor energía cohesiva y un menor volumen libre. A su vez, la película termoformada con nisina (TNI) presentó los valores más bajos.

Hernández-García y col. (2021) observaron valores similares en películas termoplásticas de almidón de mandioca de $3,7 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{m.s.Pa}$. Por otro lado, Ordóñez y col. (2021) reportaron valores de $4,2 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{m.s.Pa}$ en películas de almidón de mandioca termoformadas.

3.1.4 Solubilidad en agua (WS) y humedad

La solubilidad y humedad de las películas se muestran en la **Tabla 4.4**. El contenido de humedad de las películas de almidón coincidió con los reportados por otros autores (Menzel y col., 2019; Cano y col., 2014). Como puede observarse, estos valores se vieron significativamente afectados por el método de procesado, presentando las películas termoprocesadas valores inferiores a las películas obtenidas por casteo ($p < 0,05$). Esto podría atribuirse a la diferente disposición de las cadenas y a enlaces puente de hidrógeno establecidos en cada caso, modificando así probablemente los puntos activos de la matriz de almidón disponibles para unir moléculas de agua.

En cuanto a WS, las películas termo-comprimidas mostraron valores de solubilidad más elevados (en torno al 61%) que las películas casteadas (30%) ($p < 0,05$). En relación con las películas obtenidas por casteo, Ollé Resa y col. (2013) observaron valores similares en películas a base de almidón conteniendo o no natamicina. Mientras que, Moro y col. (2017) reportaron una solubilidad de 59.8% en películas a base de almidón por extrusión. Evidentemente, esto está directamente relacionado con la forma en que se procesaron las películas ya que, durante la etapa de termoformado, los pellets de almidón se fundieron y comprimieron sin generar una red tridimensional continua, lo que dio lugar a una matriz con menor resistencia a la acción del agua.

En todas las películas evaluadas, la presencia de antimicrobianos no modificó su WS. No hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos para una misma técnica de elaboración. Sin embargo, en un informe anterior, Ollé Resa y col. (2014) elaboraron películas a base de almidón por el método de casteo y observaron una acción plastificante de los conservantes (NANI) que redujo las interacciones de las cadenas de biopolímeros en la matriz produciendo una película más soluble.

El secado más lento en el casteo y el secado más rápido en extrusión/termo-compresión promovieron diferentes arreglos moleculares, lo que afectó el desempeño del material (La Fuente y col., 2022). Adicionalmente, el cizallamiento, la temperatura y la presión generados en las películas termoformadas pueden haber producido una estructura menos cohesiva y compacta y una matriz con menor resistencia a la acción

del agua. Por esta razón, los valores observados fueron más altos que los valores de las películas obtenidas por casteo. La técnica de casteo, donde la gelatinización del almidón es completa y posible, permite un reordenamiento de la matriz y puede retener una mayor cantidad de agua (mayor contenido de humedad).

Tabla 4.4 – Propiedades físicas de películas a base de almidón obtenidas por casteo y por termo-compresión.

Sistemas	Solubilidad (%)	Humedad (%)	PO x 10¹⁴ (cm³/m.s.Pa)	PVA (g/m.s.Pa) x10⁹
C	29,9 ± 0,7 ^{Aa}	13,9 ± 0,4 ^{Ab}	12 ± 1 ^{Ab}	1,92 ± 0,01 ^{Aa}
CNA	30,3 ± 0,5 ^{Aa}	12,3 ± 0,5 ^{Ab}	18 ± 1 ^{ABb}	1,91 ± 0,02 ^{Aa}
CNI	30,8 ± 0,6 ^{Aa}	13,6 ± 0,4 ^{Ab}	12 ± 2 ^{Ab}	1,93 ± 0,06 ^{Aa}
CNANI	30,5 ± 0,1 ^{Aa}	14,0 ± 0,3 ^{Ab}	22 ± 2 ^{Bb}	1,90 ± 0,08 ^{Aa}
Tcontrol	62,0 ± 0,4 ^{Ab}	10,3 ± 0,5 ^{Aa}	5,1 ± 0,2 ^{BCa}	1,5 ± 0,4 ^{Aa}
TNA	61,4 ± 0,3 ^{Ab}	10,4 ± 0,5 ^{Aa}	3,6 ± 0,4 ^{ABa}	2 ± 1 ^{Aa}
TNI	61,9 ± 0,7 ^{Ab}	9,9 ± 0,4 ^{Aa}	2,6 ± 0,8 ^{Aa}	2 ± 1 ^{Aa}
TNANI	61,2 ± 0,1 ^{Ab}	10,3 ± 0,5 ^{Aa}	6,3 ± 0,3 ^{Ca}	2,8 ± 0,3 ^{Ab}

Se reportan la media y la desviación estándar (n=3). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas dentro de una técnica. Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre técnicas dentro del mismo tipo de sistema.

3.1.5 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros obtenidos de las películas termoformadas se presentan en la **Figura 4.4**.

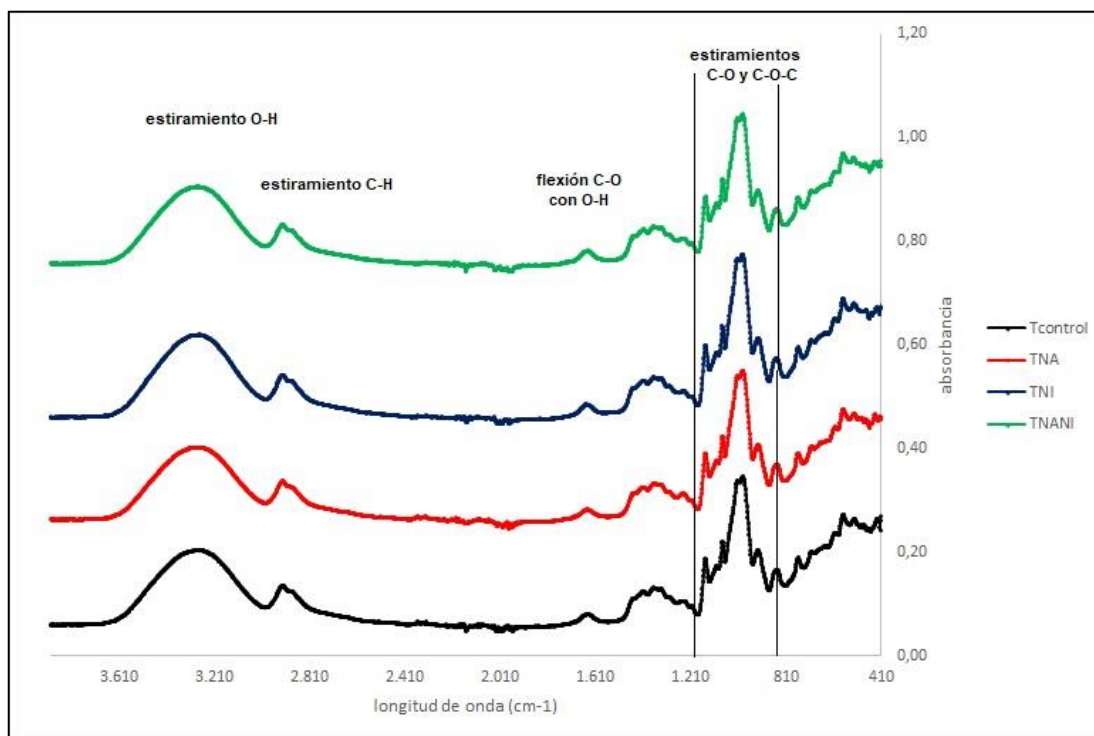


Figura 4.4 - Espectro de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de películas a base de almidón termoformadas: control (*Tcontrol*), con natamicina (*TNA*), con nisina (*TNI*) y con natamicina y nisina juntas (*TNANI*).

Los espectros observados de los 4 sistemas analizados resultaron similares, predominando el patrón típico de los materiales a base de almidón aun en los sistemas conteniendo los antimicrobianos. Todas las películas estudiadas mostraron una banda ancha que puede atribuirse al estiramiento O-H del agua y los grupos de las películas que interactúan mediante enlaces de hidrógeno como se mencionó en el **Capítulo 3 sección 3.8**. Los máximos de absorbancia fueron similares y se presentaron entre los 3276-3282 cm^{-1} . De igual manera, las bandas correspondientes a las vibraciones del agua ligada a la estructura se encontraron entre los 1645-1650 cm^{-1} con igual intensidad. Se calculó la relación de absorbancia 1650 cm^{-1} /1455 cm^{-1} como en el **Capítulo 2 sección 3.2.5** siendo en promedio 0,749. Asimismo, el promedio de los cocientes 1047 cm^{-1} /1022 cm^{-1} fue de 0,748 mientras que para el cociente 1022 cm^{-1} /995 cm^{-1} fue de 0,940. En todos los casos, no se observaron diferencias entre los sistemas.

3.1.6 Propiedades térmicas

Los resultados del ensayo termogravimétrico (TGA), curvas y su primera derivada, se observan en la **Figura 4.5**. Los valores de las transiciones térmicas se observan en las **Tablas 4.5 y 4.6**.

Las curvas TGA de todas las películas mostraron el comportamiento de degradación típico del almidón plastificado con glicerol, con un primer paso de pérdida de masa (alrededor de 60-80 °C), antes del pico de degradación principal, correspondiente a la pérdida de masa de alrededor del 0,2% en agua y glicerol enlazados (González-Seligra et al., 2017). La temperatura típica a la que se produce la degradación principal del polímero está en el rango de 250-350 °C, como Valencia-Sullca y col. (2018) que observaron una temperatura de degradación inicial de $299,5 \pm 0,3$ °C y una temperatura máxima de degradación de $319,3 \pm 0,4$ °C en películas a base de almidón con glicerol y PEG elaboradas por termo-compresión. Estos valores fueron superiores a los 200 °C, lo que garantiza la estabilidad en la elaboración de las películas. En general, no se encontraron diferencias notables en la temperatura de degradación térmica entre películas obtenidas por casteo y las películas obtenidas por termo-compresión. Por otro lado, tanto la temperatura de inicio como la de pico de máxima degradación disminuyó debido a la presencia de los antimicrobianos, en concordancia con las menores fuerzas de cohesión de estas matrices (Danilovas et al., 2014). En cuanto al tipo de antimicrobiano, las películas que incorporaban nisina (NI, NANI) mostraron una menor estabilidad térmica ($p < 0,05$) que las adicionadas con natamicina (NA). Esto se evidencia en el corrimiento a menores temperaturas del mínimo de la curva de la primera derivada (**Figura 4.4 y Tabla 4.5**).

El siguiente pico registrado en las películas activas se puede atribuir a la degradación de los antimicrobianos como se observó en el **Capítulo 3 sección 3.7**. En el caso de la nisina en las películas, se observó una degradación a temperaturas más bajas que cuando se encuentra pura (**Tabla 4.5**).

Finalmente, se observó una etapa de descomposición en las películas de almidón puro y cargadas con NA y varios eventos de degradación en las que incorporaban nisina (NI, NANI), teniendo lugar todos estos fenómenos entre 400 y 600 °C. Estos eventos se atribuyen a la degradación de los productos de fragmentación del primer paso (Danilovas et al. 2014), que diferían claramente entre la nisina y la natamicina.

Tabla 4.5 – Propiedades térmicas de películas a base de almidón obtenidas por casteo y por termo-compresión. Sistemas de control (C y Tcontrol), con nisina (CNI y TNI), con natamicina (CNA y TNA) y con nisina y natamicina (CNANI y TNANI): análisis termogravimétrico (TGA).

Sistemas	1er pico		2do pico		3er pico	
	Onset	pico	Onset	pico	Onset	pico
C	286 ± 3 ^{Ca}	315 ± 3 ^{Aa}	---	---	472 ± 9 ^{Aa}	503 ± 17 ^{Ba}
CNA	277 ± 1 ^{Ba}	302 ± 1 ^{Aa}	430 ± 5 ^b	451 ± 5 ^b	466 ± 3 ^{Aa}	474 ± 3 ^{Ab}
CNI	255 ± 2 ^{Aa}	271 ± 2 ^{Ba}	411 ± 2 ^a	439 ± 1 ^a	461 ± 10 ^{Aa}	504 ± 4 ^{Ba}
CNANI	252 ± 2 ^{Aa}	282 ± 9 ^{Ba}	411 ± 6 ^a	440 ± 3 ^a	468 ± 1 ^{Aa}	495 ± 3 ^{Ba}
Tcontrol	280 ± 7 ^{Ba}	306 ± 6 ^{Ba}	---	---	449 ± 10 ^{Aba}	493 ± 9 ^{Ba}
TNA	280 ± 3 ^{Ba}	304 ± 2 ^{Ba}	412 ± 14 ^{Aa}		491 ± 12 ^{Aa}	
TNI	263 ± 2 ^{Ab}	286 ± 1 ^{Ab}	406 ± 7 ^A	444 ± 3 ^A	468 ± 3 ^{Ba}	497 ± 3 ^{Ba}
TNANI	263 ± 1 ^{Ab}	285 ± 1 ^{Ab}	406 ± 3 ^A	446 ± 7 ^A	469 ± 6 ^{Ba}	497 ± 7 ^{Ba}
nisina	244,5 ± 0,4	282,2 ± 0,1	---	---	515 ± 2	533 ± 4
natamicina	191,87 ± 0,03	204,72 ± 0,07	444,1 ± 0,6	499,2 ± 0,2	532 ± 2	541 ± 3

Se reportan la media y la desviación estándar (n=3). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre sistemas dentro de una técnica. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre técnicas dentro del mismo tipo de sistema.

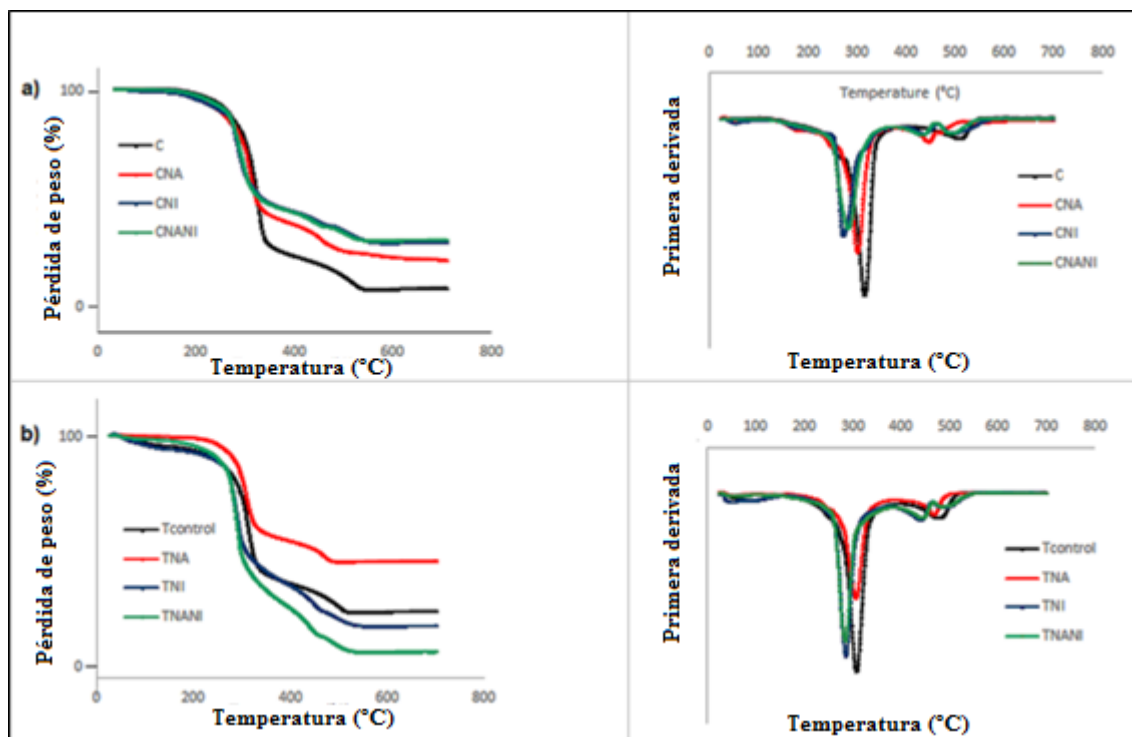


Figura 4.5 – Análisis termogravimétrico (TGA): curvas de pérdida de peso (izquierda) y su primera derivada (derecha) de películas a base de almidón obtenidas por casting (a), por termo-compresión (b).

Tabla 4.6 – Propiedades térmicas de películas a base de almidón obtenidas por casting y por termo-compresión: calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Sistemas	1er calentamiento (°C)		enfriamiento (°C)		2do calentamiento (°C)	
	T _{onset}	T _{midpoint}	T _{onset}	T _{midpoint}	T _{onset}	T _{midpoint}
C	84 ± 9 ^{Bb}	87 ± 10 ^{Ba}	97 ± 14 ^B	94 ± 9 ^B	90 ± 7 ^{Bb}	97 ± 2 ^{Cb}
CNA	55 ± 4 ^{Ab}	57 ± 3 ^{Ab}	53 ± 1 ^A	52 ± 1 ^A	58 ± 15 ^{Aa}	66 ± 6 ^{Bb}
CNI	55 ± 5 ^{Aa}	61 ± 7 ^{Aa}	58 ± 8 ^A	60 ± 9 ^A	59 ± 2 ^{Aa}	61 ± 3 ^{Ba}
CNANI	51 ± 5 ^{Aa}	59 ± 3 ^{Aa}	47 ± 6 ^A	48 ± 8 ^A	45 ± 2 ^{Aa}	47 ± 1 ^{Aa}
Tcontrol	59 ± 6 ^{Aa}	64 ± 10 ^{Aa}	---	---	59 ± 1 ^{Aa}	62 ± 7 ^{Ba}
TNA	38 ± 4 ^{Aa}	45 ± 2 ^{Aa}	---	---	43 ± 3 ^{Aa}	46,2 ± 0,4 ^{Aa}
TNI	53 ± 3 ^{Aa}	56 ± 3 ^{Aa}	---	---	55 ± 5 ^{Aa}	54,23 ± 0,02 ^{Aa}
TNANI	49 ± 9 ^{Aa}	54 ± 11 ^{Aa}	---	---	56 ± 7 ^{Aa}	59 ± 3 ^{ABb}

Se reportan la media y la desviación estándar (n=3). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas dentro de una técnica. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre técnicas dentro del mismo tipo de sistema.

Resultados similares fueron informados por Menzel y col. (2019), quienes observaron un pico alrededor de 250 °C el cual se asignó a la degradación del glicerol y un pico entre 250 y 300 °C correspondiente a la descomposición térmica de películas a base de almidón con o sin extracto antioxidante de aceites esenciales.

Adicionalmente, para conocer las propiedades estructurales de los biopolímeros que constituyen las películas, se realizaron ensayos de DSC a fin de determinar la presencia de transiciones vítreas y su correspondiente temperatura (T_g) a través de dos corridas. La segunda corrida se realiza a fin de comparar los picos obtenidos habiendo eliminado la historia térmica. Este parámetro T_g resulta de gran importancia para conocer la estabilidad de las películas a temperatura ambiente y de almacenamiento. Se determinó la T_g de películas completamente secas, para eliminar el efecto plastificante del agua, y así poder analizar el efecto potencial de los antimicrobianos y el tipo de técnica utilizada. El inicio y el punto medio de las transiciones vítreas se muestran en la **Tabla 4.6**.

La **Figura 4.6** muestra los termogramas del primer calentamiento de películas realizadas con diferentes métodos filmógenos (casteo y termo-compresión). Como era de esperar, los valores de T_g obtenidos en el 1er calentamiento fueron menores que en el 2º calentamiento de acuerdo con la pérdida de agua durante el procesado térmico efectuado en el primer calentamiento de la muestra. Estos valores de T_g de las películas de almidón puro se encuentran en el rango de los reportados por otros autores (Valencia-Sullca y col., 2018; Jha y col., 2020; Hazrati y col., 2021). Normalmente, la T_g de las películas aumenta con el aumento de la rigidez de la matriz y con el aumento de las fuerzas de atracción intermoleculares e intramoleculares.

Se observaron valores de T_g más elevados ($p < 0,05$) en las películas obtenidas por casteo en comparación con las obtenidas por termo-compresión. Esto concuerda con el establecimiento de una red polimérica amorfa más cohesiva donde las interacciones entre cadenas restringen su movimiento rotacional, lo que conduce a un incremento en los valores de T_g . La incorporación de antimicrobianos pareció promover un efecto plastificante, siendo este efecto significativo sólo en las películas obtenidas por casteo ($p < 0,05$), donde los valores de T_g se redujeron en unos 36 °C. Esto sugiere de nuevo que los compuestos antimicrobianos aumentaron el volumen libre de las cadenas poliméricas y promovieron su movilidad molecular (Dalnoki-Veress et al., 2001), de acuerdo con los resultados observados en las propiedades de barrera de las películas. Otros estudios (Liu et al., 2019; Luciano et al., 2021) también informaron del efecto

plastificante de estos antimicrobianos en diferentes películas. El tipo de antimicrobiano (NI, NA, NANI) no afectó significativamente a los valores de T_g ($p > 0,05$), mostrando valores de T_g en torno a 54 ± 5 °C y 47 ± 9 °C para las películas antimicrobianas de almidón obtenidas por casteo y por termo-compresión, respectivamente.

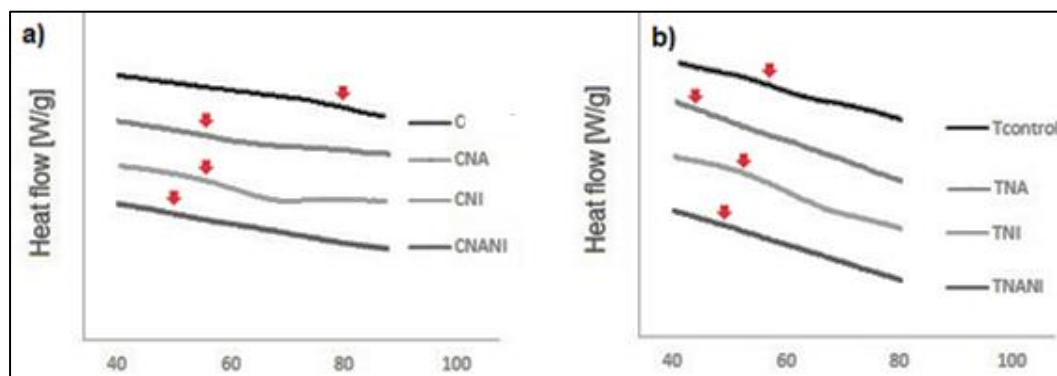


Figura 4.6 Termogramas DSC del primer calentamiento de películas realizadas con diferentes métodos: a) casteo y b) termo-compresión.

Independientemente de la técnica empleada, se encontró que la T_g obtenida estaba por encima de la temperatura ambiente. Resultó que el proceso de obtención de las películas fue el responsable de la disminución de la T_g con relación a la técnica de casteo debido a que promovieron la constitución de una matriz con mayor volumen libre y movilidad.

3.1.7 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

La microscopía FESEM se utilizó para examinar cualitativamente la microestructura y la adhesión interfacial de la matriz de almidón y los antimicrobianos. Las imágenes de las secciones transversales de la película se muestran en la **Figura 4.7**. Las películas mostraron superficies lisas y sin grietas, sin poros ni separaciones de fase, lo que sugiere una buena estructura interna. Este aspecto resultó típico de las películas a base de almidón de acuerdo con los resultados obtenidos también por Menzel y col. (2020) y Freitas y col. (2023). Las películas obtenidas por casteo mostraron un espesor ligeramente más grueso, mientras que las películas obtenidas por termo-compresión exhibieron una matriz más compacta. En ninguno de los casos se observaron gránulos de almidón dispersos en las matrices poliméricas, esto indicó que todos los procesos térmicos aplicados fueron adecuados para gelatinizarlo o desestructurar los gránulos.

Considerando las películas por casteo (**Figura 4.7.a, 4.7.c, 4.7.e y 4.7.g**), se observaron algunas pequeñas burbujas en la matriz debido al proceso de producción. Mientras que, en el caso de la técnica de termo-compresión, las películas (**Figura 4.7.b, 4.7.d, 4.7.f y 4.7.h**) fueron más frágiles y quebradizas después del tratamiento para la observación por FESEM (una semana en P₂O₅, nitrógeno líquido y platinado). Esto puede deberse al menor contenido de agua retenida en estas películas y la matriz que se genera con esta técnica diferente a la matriz generada por casteo (Chuaynukul y col., 2017).

Asimismo, en las películas de CNA y TNA (**Figura 4.7.c y 4.7.d**), fue posible observar cristales de natamicina entre 10-25 μm y 2-8 μm, respectivamente. Estos cristales se integraron y distribuyeron correctamente formando parte de la matriz (buena adhesión interfacial) en concordancia con lo reportado por Ollé Resa y col. (2013). Estos resultados podrían estar indicando una mejor integración del antimicrobiano en las películas termo-formadas. No se observaron partículas de nisina en las películas que contenían dicho antimicrobiano ya que estaba totalmente integrado a la matriz (Leelaphiwat y col., 2022). Asimismo, las películas CNANI y TNANI que contenían natamicina y nisina no mostraron cristales de natamicina. Esto podría deberse a una mejora en la interacción de los componentes con la presencia de ambos antimicrobianos, generando una matriz más homogénea.

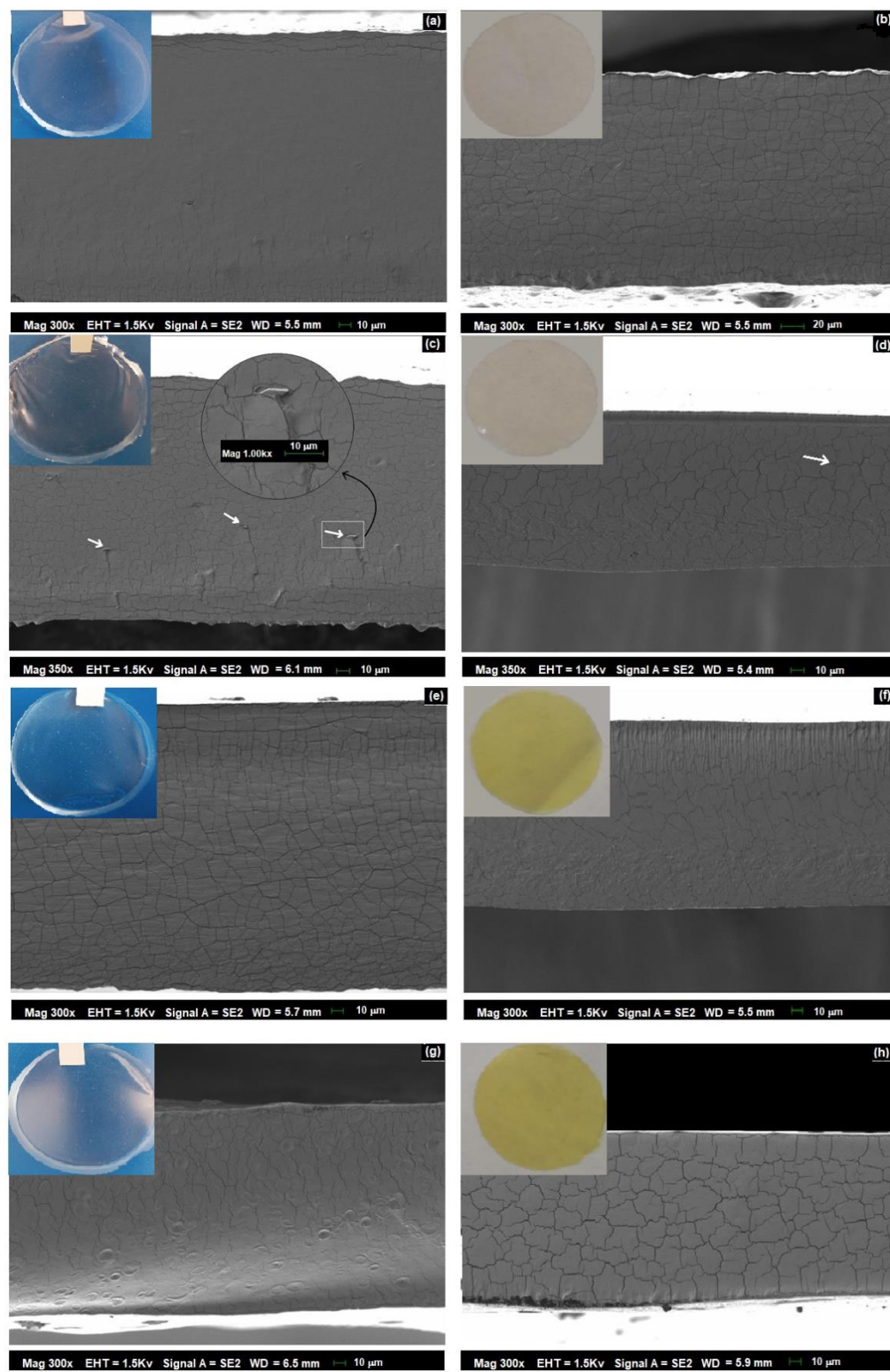


Figura 4.7- Micrografías de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) de la sección transversal de las películas obtenidas por casteo y por termo-compresión. Las flechas indican los cristales de natamicina.

3.2 Actividad antimicrobiana de las películas

3.2.1 Difusión de los antimicrobianos en medio semisólido (*Ensayo del halo*)

Los resultados de la prueba de difusión indicaron que las películas sin antimicrobianos (Control y Tcontrol) no permitieron la formación de halos, demostrando que estas películas no presentaban propiedades antimicrobianas. Por otro lado, en películas obtenidas por casteo, se observaron dos zonas de inhibición superpuestas del mismo modo que se observó en el **Capítulo 2 sección 3.3.1**. Un halo de menor diámetro que corresponde a la zona de inhibición de *L. innocua* por acción de nisina, y un halo de mayor diámetro que corresponde a la zona de inhibición de *S. cerevisiae* por acción de natamicina. Por el contrario, se observó un halo único en las películas por termo-compresión correspondiente a la inhibición de *S. cerevisiae*. Los diámetros de los halos para natamicina fueron CNA y CNANI: $2,3 \pm 0,1$ cm, TNA y TNANI: $1,75 \pm 0,1$ cm. Para nisina fueron CNI: $2,0 \pm 0,1$ cm y CNANI: $2,1 \pm 0,1$ cm. Por lo tanto, la difusión y acción de la natamicina fue posible en las películas evaluadas, observándose una ligera disminución de la acción en las películas termoformadas con respecto a las casteadas, probablemente debido a una degradación durante el proceso de termo-compresión. Por otro lado, es posible que durante el proceso de elaboración de las películas termoformadas la nisina quede retenida en la matriz o se degrade ya que no se observaron halos de inhibición. Considerando estos resultados, los siguientes ensayos se realizaron únicamente con sistemas conteniendo natamicina y los controles correspondientes puesto que la nisina no presentó actividad antimicrobiana.

Al analizar las películas TNA, CNA y Tcontrol colocadas en agar YGC con césped de *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* y *Z. bailli* se observaron halos de inhibición con las dos primeras películas evaluadas por acción de la natamicina presente (**Tabla 4.6**). Asimismo, se presentaron mayores halos en la película elaborada por casteo en relación a la termoformada. Esto puede deberse a una disminución de la capacidad antimicrobiana de la natamicina por el procesamiento de termo-compresión. Se destaca que *Z. rouxii* resultó ser el microorganismo más resistente al presentar menores valores en los halos de inhibición.

Tabla 4.6 Halos de inhibición en mm de los microorganismos *Z. bailii*, *Z. rouxii* y *S. cerevisiae* para películas con natamicina (CNA y TNA) y película control sin antimicrobiano (Tcontrol) sobre agar YGC.

Sistemas	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Tcontrol	---	---	---
TNA	1.2 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^b
CNA	2.2 ± 0.2 ^b	2.1 ± 0.1 ^b	2.5 ± 0.1 ^c

3.2.2 Actividad de barrera antimicrobiana de películas sobre queso Port Salut

El ensayo de barrera sobre queso Port Salut recubierto con las distintas películas y el queso sin recubrir puede observarse en la **Figura 4.8**. El desarrollo de la contaminación en el queso sin recubrir y en las películas Tcontrol, TNA y CNA retiradas de los quesos se muestra en la **Figura 4.9**. El queso sin recubrir y la película Tcontrol permitieron el crecimiento de *Z. bailii* (**Figura 4.9.a**), *Z. rouxii* (**Figura 4.9.b**) y *S. cerevisiae* (**Figura 4.9.c**) sin restricciones, comenzando con un recuento de 4,6; 4,3 y 5 log (UFC / mL) respectivamente y llegando al final del almacenamiento con aproximadamente 7 log (UFC / mL). Por otro lado, las películas de los quesos recubiertos con CNA presentaron valores por debajo del límite de detección luego de las 120 h para *Z. bailii* y *S. cerevisiae*, luego de 24 h *Z. rouxii* manteniéndose hasta el final del almacenamiento (168 hs) para todos los microorganismos evaluados. Estas películas resultan ser las más efectivas frente a una contaminación post-proceso. Considerando las películas TNA, se observa que luego de 48 h los microorganismos *Z. bailii* y *Z. rouxii*, que se encontraban en valores por debajo del límite de detección, presentaron un crecimiento de 5 ciclos log (1.5 ciclos por debajo del queso sin recubrir). Para *S. cerevisiae*, si bien se logró una disminución del crecimiento las primeras 48hs, luego el recuento fue de 6 ciclos log (1 ciclo log por debajo del queso sin recubrir). Por lo tanto, este recubrimiento no resulta ser efectivo como barrera frente a una contaminación post-proceso durante un tiempo prolongado. Posiblemente se requieran de mayores concentraciones de natamicina ya que esta pudo verse afectada durante el procesamiento por termo-compresión y, por lo tanto, presentar menor actividad. Adicionalmente, se observó que los quesos previamente cubiertos con las películas y luego de removerlas de la superficie, tuvieron recuentos por debajo del límite de detección durante el almacenamiento (los valores difieren significativamente respecto a los valores del queso sin recubrir, $p < 0.05$). Por

tanto, estas películas evitaron el paso de los microorganismos inoculados a la superficie del queso.

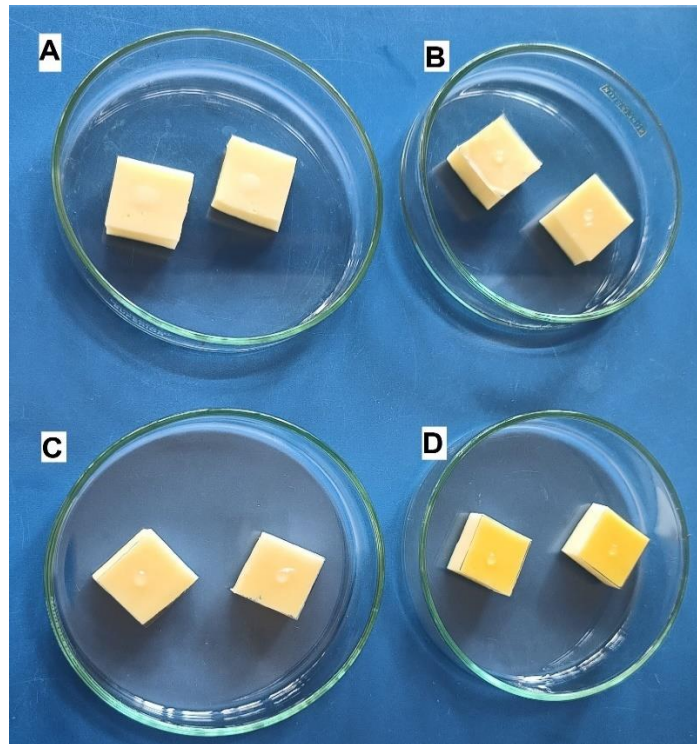


Figura 4.8 - Ensayo de barrera en queso argentino Port Salut, almacenamiento a 12 °C. A) Queso sin recubrir, B) queso con película control por termo-compresión ($T_{control}$), C) queso con película con natamicina obtenida por casteo (CNA), D) película con natamicina obtenida por termo-compresión (TNA).

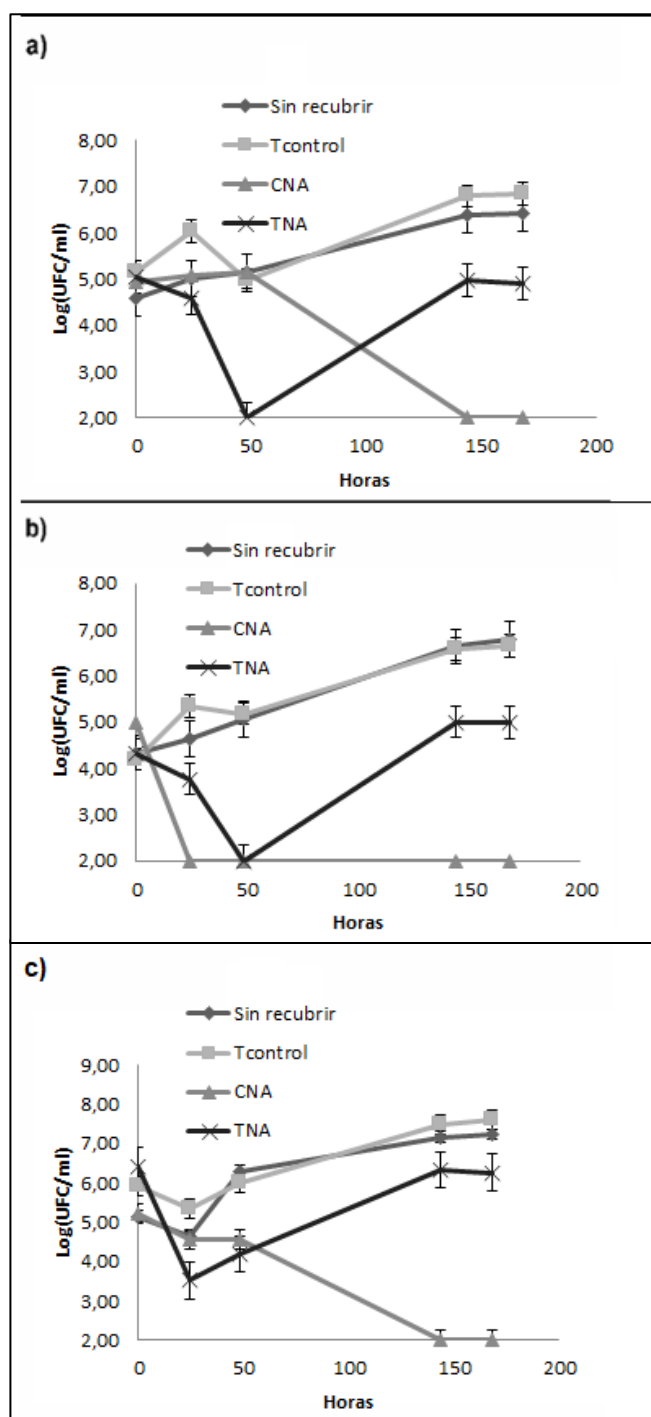


Figura 4.9 - Análisis de barrera sobre películas inoculadas con cultivos simples apoyadas sobre queso Port Salut argentino y almacenadas a 12 °C. Película sin antimicrobianos obtenida por termo-compresión (Tcontrol), película con natamicina obtenida por termo-compresión (TNA) y película con natamicina obtenida por casteo (CNA). Queso sin película (Sin recubrir).
Panel a: *Zygosaccharomyces bailii*. Panel b: *Zygosaccharomyces rouxii*. Panel c: *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.3 Difusión de la natamicina en películas sobre queso Port Salut

Se analizó la capacidad de difusión de la natamicina desde las películas hacia el queso Port Salut argentino inoculado con *Z. bailii* (Fig. 4.5.a), *Z. rouxii* (Fig. 4.5.b) y *S. cerevisiae* (Fig. 4.5.c). Se evaluó el crecimiento de estos en almacenamiento a 12 °C (temperatura de abuso).

La **Figura 4.10.a** presenta la respuesta de *Z. bailii* presente en quesos cubiertos con CNA, TNA y sin recubrir. Por un lado, en estos últimos, se observa un aumento de 2 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento (inóculo inicial de 4.5 ciclos log y final de 6.5). Por el contrario, los quesos recubiertos con CNA y TNA mostraron una disminución en el recuento de esta levadura luego de 48 h y hasta 168 h de almacenamiento, alcanzaron valores por debajo del límite de detección, permitiendo una mejor conservación del producto (valores difieren significativamente de los quesos sin recubrir, $p < 0.05$).

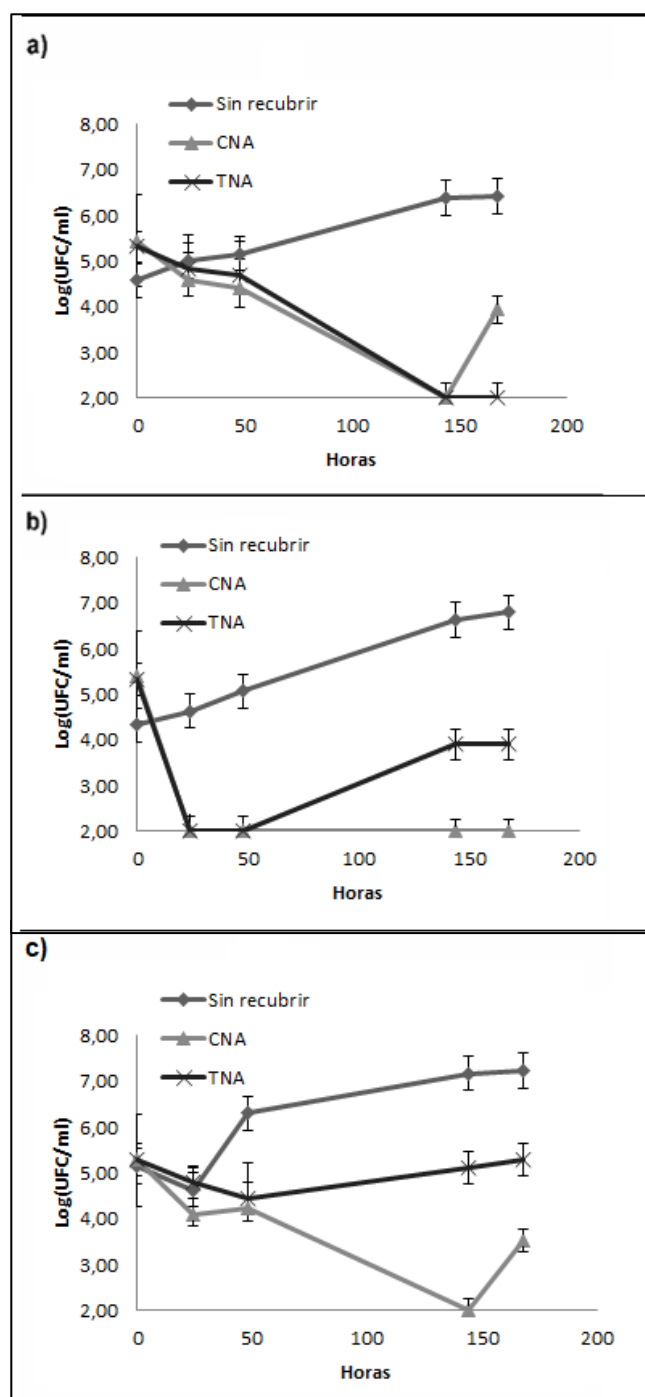


Figura 4.10 - Ensayo de difusión en queso argentino Port Salut, almacenamiento a 12 °C. Las muestras de queso se cubrieron con: película con natamicina obtenida por casteo (CNA) y película con natamicina obtenida por termo-compresión (TNA). Queso sin película (sin recubrir). Panel a: *Zygosaccharomyces bailii*. Panel b: *Zygosaccharomyces rouxii*. Panel c: *Saccharomyces cerevisiae*.

De manera similar, en la **Figura 4.10.b** se representa la respuesta de *Z. rouxii*. En quesos sin recubrir se observa un crecimiento de 2.5 ciclos log (inóculo inicial de 4 ciclos log y final de 6.5). Mientras que los quesos recubiertos con CNA y TNA mostraron una disminución en el recuento de estas levaduras luego de 48 h y hasta 144 h de almacenamiento. En particular, los quesos recubiertos con TNA presentaron un recrecimiento luego de las 144 h llegando aproximadamente a 4 ciclos log. Esto posiblemente se deba al tipo de procesamiento para la obtención de la película termoformada produciendo una disminución de la acción antimicrobiana de la natamicina. Similar a lo observado en el ensayo de difusión en agar. Es de destacar que este microorganismo resulta más resistente a la acción del antimicrobiano.

Por último, en la **Figura 4.10.c** se representa la respuesta de *S. cerevisiae*. En quesos sin recubrir se observa un crecimiento de 2 ciclos log (inóculo inicial de 5 ciclos log y final de 7). Por el contrario, los quesos recubiertos TNA mostraron una disminución de alrededor de 1 ciclo log en el recuento de estas levaduras luego de 24 h y hasta el final del almacenamiento. Mientras que, los quesos recubiertos con CNA presentaron una disminución de 3 ciclos log a las 144 h que aumentó significativamente 1 ciclo log a las 168 h. Esto posiblemente, igual que en los casos anteriores, se deba al tipo de procesamiento para la obtención de la película termoformada produciendo una disminución de la acción antimicrobiana de la natamicina. Esta disminución de actividad de natamicina en películas termoformadas es coincidente con lo observado para *Z. rouxii* en el ensayo de difusión en agar.

4 Conclusiones

En este capítulo se muestran los resultados correspondientes al desarrollo y caracterización de películas a base de almidón de mandioca y glicerol, como soporte de natamicina y/o nisina, mediante la técnica de termo-compresión y se compararon sus propiedades con las correspondientes a películas elaboradas por casteo.

Las películas obtenidas por casteo fueron más transparentes, resistentes a la ruptura y elásticas mientras que las películas termoformadas fueron mejor barrera al oxígeno y menos húmedas, presentando una estructura más homogénea. Las mejores propiedades mecánicas de las películas casteadas en comparación con las termoformadas se debieron probablemente a la mejor disposición de las cadenas poliméricas durante la fase de secado lento. Este efecto no confirió mejores propiedades de barrera al vapor de agua a estas películas, seguramente debido a que su mayor contenido en agua dio lugar a un mayor volumen libre de la matriz polimérica.

A su vez, se observó que solo la natamicina fue capaz de mantener su actividad antifúngica, independientemente del tipo de tecnología utilizada para la fabricación de la película. Por el contrario, la nisina sólo estuvo disponible cuando se incorporó a películas casteadas. Por lo tanto, la máxima actividad antimicrobiana, en las concentraciones evaluadas, frente a una contaminación combinada de *L. innocua* y *S. cerevisiae* pudo obtenerse cuando las películas que incorporan ambos antimicrobianos se fabricaron con la técnica de casteo.

Por último, las condiciones de procesamiento y la formulación utilizadas en la técnica de termo-compresión deben optimizarse para minimizar la degradación térmica de los antimicrobianos y obtener mejores características en los materiales generados de manera de proponer un cambio de escala.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación se estudió la influencia de la formulación y del proceso de obtención sobre las propiedades de películas comestibles. Se demostró que la adición de rellenos a base de sub-productos agrícolas a películas de almidón de mandioca plastificadas con glicerol y elaboradas por la técnica de casteo mejora las propiedades mecánicas y de solubilidad y mantiene la acción antimicrobiana en relación con las películas no reforzadas.

En cuanto al estudio de incorporación de **salvado de arroz procesado** (PRB) a la formulación de las películas elaboradas por la técnica de casteo y recubrimientos, se pudo establecer que:

- ✓ Las películas con 0,2% de PRB y 2% de glicerol, mostraron mayores valores de esfuerzo a la ruptura y deformación a la ruptura y un menor valor de solubilidad en agua, presentando una compatibilidad óptima entre relleno y matriz.
- ✓ Las películas y recubrimientos con PRB permitieron la disponibilidad y actividad de los antimicrobianos tanto para erradicar una contaminación post-proceso previa al empaquetamiento del queso Port Salut, como para eliminar una contaminación externa.
- ✓ En la formulación de los recubrimientos, fue necesario incrementar la concentración de los antimicrobianos para lograr una acción de barrera efectiva equivalente a las películas desarrolladas.

En el caso de la adición de **expeller de soja sonicado** (SSE) a la formulación de las películas elaboradas por casteo y recubrimientos, se pudo determinar que:

- ✓ La incorporación de 1,4% de glicerol y 0,46% de SSE dio como resultado una película con alta resistencia a la ruptura y baja solubilidad en agua.
- ✓ Las películas y recubrimientos desarrollados permitieron la disponibilidad y actividad de los antimicrobianos tanto para prevenir una contaminación post-proceso previa al empaquetamiento del queso Port Salut, como para eliminar una contaminación externa.

- ✓ Las películas con SSE se biodegradaron casi por completo luego de siete días en compost.

Para películas activas reforzadas con **salvado de arroz procesado** o **expeller de soja sonicado** y constituidas por casteo (Capítulos 2 y 3), y considerando los sistemas optimizados, se observó que:

- ✓ Las películas con 0,46% de SSE resultaron más luminosas, resistentes a la tracción y deformables y menos amarillas y solubles que las películas con 0,2% de PRB.
- ✓ Ambas películas resultaron igualmente efectivas para mejorar la calidad microbiológica del queso Port Salut.

Es interesante señalar que los sub-productos estudiados mostraron comportamientos diferentes frente al tratamiento con ultrasonido, posiblemente debido al tipo y cantidad de componentes que los constituyen. Esta respuesta específica de cada relleno, condiciona su compatibilidad con la matriz de almidón y, por lo tanto, su capacidad para actuar como refuerzo en este tipo de materiales.

Comparando las técnicas de casteo y de termo-compresión para la elaboración de películas con almidón de mandioca con o sin agregado de natamicina y/o nisina, se observó que:

- ✓ Las películas casteadas fueron más transparentes, resistentes a la ruptura y deformables mientras que las películas termoformadas fueron mejor barrera al oxígeno, con menor humedad y presentaron una matriz más homogénea
- ✓ La técnica de casteo generó películas con buenas propiedades como barrera frente a una contaminación combinada de *L. innocua* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, los sistemas termo-comprimidos resultaron con una menor capacidad de barrera frente a los microorganismos analizados, posiblemente debido al impacto del tratamiento de termo-compresión sobre la actividad de los antimicrobianos, en particular sobre la nisina.

Cabe destacar que el recubrimiento con antimicrobianos es una tecnología que se puede transferir fácilmente a la industria como un paso adicional a ser aplicado al finalizar el proceso de elaboración del alimento. De este modo, esta matriz contribuiría a una mejor conservación de un alimento como el queso durante su almacenamiento.

A su vez, la tecnología de termo-compresión permitiría un cambio de escala para la fabricación de las películas biodegradables desarrolladas mediante la implementación de un proceso respetuoso con el medio ambiente.

En todos los casos analizados, será necesario realizar, en una etapa posterior, ensayos sensoriales y de aceptabilidad de consumidores que permitan validar la aplicación de estas matrices

Esta investigación presenta un enfoque ecológico y circular para desarrollar películas y recubrimientos a base de biocompuestos que puedan ser utilizados como material de envasado activo y biodegradable para la conservación de alimentos. A su vez, representa un aporte a la comprensión del efecto de la formulación y del proceso de elaboración en las propiedades de películas a base de almidón. Asimismo, ofrece herramientas para obtener alternativas factibles a los envases convencionales y, al mismo tiempo, otorgar al consumidor un producto más seguro. De esta manera, sienta las bases para realizar futuros trabajos que permitan optimizar tanto las formulaciones como los procesos para obtener, de manera escalable, películas y recubrimientos con propiedades competitivas con los materiales de envasado tradicionales.

REFERENCIAS

- Abdul Khalil, H. P. S., Chong, E. W. N., Owolabi, F. A. T., Asniza, M., Tye, Y. Y., Rizal, S., ... & Paridah, M. T. (2019). Enhancement of basic properties of polysaccharide-based composites with organic and inorganic fillers: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(12), 47251.
- Adebisi, A., Adebisi, A., Jin, D., Ogawa, T., & Muramoto, K. (2008). Rice bran protein-based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3), 476–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01475.x>
- Ahmadi, E., Sareminezhad, S., & Azizi, M. H. (2011). The effect of ultrasound treatment on some properties of methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1399–1401.
- Alirezalu, K., Pirouzi, S., Yaghoubi, M., Karimi-Dehkordi, M., Jafarzadeh, S., & Khaneghah, A. M. (2021). Packaging of beef fillet with active chitosan film incorporated with ϵ -polylysine: An assessment of quality indices and shelf life. *Meat Science*, 176, 108475.
- Alzate, P., Miramont, S., Flores, S., & Gerschenson, L. (2017). Effect of the potassium sorbate and carvacrol addition on the properties and antimicrobial activity of mandioca starch – Hydroxypropyl methylcellulose edible films. *Starch/Staerke*, 69(5–6), 1–9. <https://doi.org/10.1002/star.201600261>
- Ambigaipalan, P., Hoover, R., Donner, E., & Liu, Q. (2013). Retrogradation characteristics of pulse starches. *Food Research International*, 54(1), 203-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.012>
- Amit, S. K., Uddin, M., Rahman, R., Islam, S. M., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(1), 1-22.
- Angles, M. N., & Dufresne, A. (2000). Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 1. Structural analysis. *Macromolecules*, 33(22), 8344-8353. <https://doi.org/10.1021/ma0008701>
- ANMAT. Manual de Manipulación Higiénica de alimentos (2022).
- AOAC 934.01, 942.05 and 960.39 (2005) Official methods of analysis (18th ed.). MD: Association of Official Analytical Chemists.

- AOAC 991.42 (1998). Official methods of analysis (15th ed.). MD: Association of Official Analytical Chemists.
- Arismendi, C., Chillo, S., Conte, A., Del Nobile, M. A., Flores, S., & Gerschenson, L. N. (2013). Optimization of physical properties of xanthan gum/mandioca starch edible matrices containing potassium sorbate and evaluation of its antimicrobial effectiveness. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 290-296.
- Aristizábal, J., Sánchez, T., & Lorío, D. M. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca (Vol. 163, p. 137). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- Arteaga, M. R., Soares, N. D. F., & Durango, A. M. (2011). Filmes y recubrimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos.
- ASTM D1925 (1988). Standard Test Method for Yellowness Index of Plastics. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Avérous, L., & Halley, P.J. (2009). Biocomposites based on plasticized starch. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 3(3), 329-343. <https://doi.org/10.1002/bbb.135>
- Azarifar, M., Ghanbarzadeh, B., Khiabani, M. S., Basti, A. A., Abdulkhani, A., Noshirvani, N., & Hosseini, M. (2019). The optimization of gelatin-CMC based active films containing chitin nanofiber and *Trachyspermum ammi* essential oil by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 208, 457-468.
- Barbosa-Canovas, G. V., Pierson, M. D., Zhang, Q. H., & Schaffner, D. W. (2000). Pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 65(8), 65-79.
- Barón, A. (2005). Historia de la conservación de los alimentos. *La alimentación y la nutrición a través de la historia*, 447-462.
- Basch, C. Y., Jagus, R. J., & Flores, S. K. (2013). Physical and antimicrobial properties of mandioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2419-2428.
- Bashir, M. A. (2021). Use of dynamic mechanical analysis (DMA) for characterizing interfacial interactions in filled polymers. *Solids*, 2(1), 108-120.
- Batiha, G. E. S., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E., ... & Cruz-Martins, N. (2021). Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control*, 126, 108066.

- Bernhardt, D. C., Pérez, C. D., Fissore, E. N., De'Nobili, M. D., & Rojas, A. M. (2017). Pectin-based composite film: Effect of corn husk fiber concentration on their properties. *Carbohydrate polymers*, 164, 13-22.
- Berti, S., Ollé, C. P., Basanta, F., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2019). Food Bioscience Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, 31, 100447.
- Bodirlau, R., Teaca, C. A., & Spiridon, I. (2013). Influence of natural fillers on the properties of starch-based biocomposite films. *Composites Part B: Engineering*, 44(1), 575-583.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R. A., Siezen, R. J., Kuipers, O. P., & de Kruijff, B. (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. *Biochemistry*, 36(23), 6968–6976.
- Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G., & De Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 278, 2361–2364.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30(2), 317–327.
- Byun, Y., & Kim, Y. T. (2014). Chapter 14 Bioplastics for food packaging: chemistry physics. In J. H. Han (Ed.). *Innovations in food packaging* (pp. 353–368). (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- CAA. (2010). Alimentos lácteos. In *CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO* (p. Artículos 553 al 642).
- CAA. (2014). Aditivos Alimentarios. In *CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO* (p. Artículos: 1391 al 1406).
- Cano, A., Jiménez, A., Cháfer, M., González, C., & Chiralt, A. (2014). Effect of amylose:amylopectin ratio and rice bran addition on starch films properties. *Carbohydrate Polymers*, 111, 543–555.
- Capitan Vallvey, L. F. (2000). Rapid Ultraviolet Spectrophotometric and Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Natamycin in Lactoserum Matrix. *Journal of AOAC international*, 83(4), 802–808.

- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M. (2016). Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*.
- Cerqueira, M., Lima, A., Souza, B., Teixeira, J., Moreira, R., & Vicente, A. (2009). Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1456–1462. <https://doi.org/10.1021/jf802726d>
- Chen, J., Wang, X., Long, Z., Wang, S., Zhang, J., & Wang, L. (2020). Preparation and performance of thermoplastic starch and microcrystalline cellulose for packaging composites: Extrusion and hot pressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2295-2302.
- Chen, Y., Liu, C., Chang, P., Cao, X., & Anderson, D. (2009). Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fiber: Effect of hydrolysis time. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.030>
- Chen, Z., Xu, Y. and Shivkumar, S. (2018), Microstructure and tensile properties of various varieties of rice husk. *J. Sci. Food Agric*, 98: 1061-1070. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8556>
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L., & Del Nobile, M. A. (2008). Influence of Glycerol and chitosan on mandioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88(2), 159-168.
- Christiansen MV, Pedersen TB, Brønd JN et al (2020) Physical properties and storage stability of reverse osmosis skim milk concentrates: effects of skim milk pasteurisation, solid content and thermal treatment. *J Food Eng* 278:109922. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.109922>.
- Chuaynukul, K., Nagarajan, M., Prodpran, T., Benjakul, S., Songtipya, P., & Songtipya, L. (2018). Comparative characterization of bovine and fish gelatin films fabricated by compression molding and solution casted methods. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(3), 1239-1252.
- Civelek, I., & Cagri-mehmetoglu, A. (2019). Determination of Antifungal Effect of Edible Coatings Containing *Williopsis saturnus* var. *saturnus* Against Yeast and Mold Growth on Kashar Cheese. *Journal of Food Science*, 84(2), 311–318.

- Civelek, I., & Cagri-mehmetoglu, A. (2019). Determination of Antifungal Effect of Edible Coatings Containing *Williopsis saturnus* var. *saturnus* Against Yeast and Mold Growth on Kashar Cheese. *Journal of Food Science*, 84(2), 311–318.
- Costa, M. J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Research International*, 107, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- Cruz-Díaz, K., Cobos, A., Fernández-Valle, M. E., Díaz, O., & Cambero, M. I. (2019). Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 22. Article 100397.
- Dalnoki-Veress, K., Forrest, J. A., Murray, C., Gigault, C., & Dutcher, J. R. (2001). Molecular weight dependence of reductions in the glass transition temperature of thin, freely standing polymer films. *Physical Review E*, 63(3), 031801.
- Danilovas, P. P., Rutkaite, R., & Zemaitaitis, A. (2014). Thermal degradation and stability of cationic starches and their complexes with iodine. *Carbohydrate polymers*, 112, 721-728.
- Davidson, P. M., Cekmer, H. B., Monu, E. A., & Techathuvanan, C. (2015). The use of natural antimicrobials in food: an overview. *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*, 1-27.
- Daybelis, I., Valdés, F., Silvia, D., Baños, B., Dayvis, I., & Valdés, F. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. 24(3), 52–57. ISSN 2071-0054
- De Corato U. 2019. The market of the minimally processed fresh produce needs of safer strategies for improving shelf life and quality: a critical overview of the traditional technologies. *Open Access J. Agric. Res.*, 4: 1-23.
- de Oliveira, A. C. S., Ferreira, L. F., de Oliveira Begali, D., Ugucioni, J. C., de Sena Neto, A. R., Yoshida, M. I., & Borges, S. V. (2021). Thermoplasticized pectin by extrusion/thermo-compression for film industrial application. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 2546-2556.
- de Vargas, V. H., Marczak, L. D. F., Flôres, S. H., & Mercali, G. D. (2022). Advanced technologies applied to enhance properties and structure of films and coatings: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 15(6), 1224-1247.

- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., & Hugenholz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193–202.
- Donhowe, I., & Fennema, O. (1994). Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 1–24).
- Doyle, M., Beuchat, L., & Montville, T. (2001). *Food microbiology. Fundamentals and frontiers*. Washinton DC: American Society for Microbiology.
- Edhirej, A., Sapuan, S., Jawaid, M., & Zahari, N. (2017). Cassava/sugar palm fiber reinforced cassava starch hybrid composites: Physical, thermal and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.045>
- Edhirej, A., Sapuan, S., Jawaid, M., & Zahari, N. (2017). Cassava/sugar palm fiber reinforced cassava starch hybrid composites: Physical, thermal and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 75–83.
- Famá, L., Gerschenson, L., & Goyanes, S. (2009). Starch-vegetable fibre composites to protect food products. *Carbohydrate polymers*, 75(2), 230-235. doi:10.1016/j.carbpol.2008.06.018
- Fang JM, Fowler PA, Tomkinson J, Hill CAS. The preparation and characterization of a series of chemically modified potato starches. *Carbohydrates Polymer* 2002;47(3):245–52.
- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52-57.
- Fernández, M. V., Jagus, R. J., & Mugliaroli, S. L. (2014). Effect of combined natural antimicrobials on spoilage microorganisms and *Listeria innocua* in a whey cheese “Ricotta”. *Food and bioprocess technology*, 7(9), 2528-2537.
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2007). Physical properties of mandioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.004>

- Freitas, P. A., Arias, C. I. L. F., Torres-Giner, S., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2021). Valorization of rice straw into cellulose microfibrils for the reinforcement of thermoplastic corn starch films. *Applied Sciences*, 11(18), 8433.
- Freitas, P., Gonzalez-Martínez, C. and Chiralt, A. (2023). Antioxidant starch composite films containing rice straw extract and cellulose fibres. *Food Chemistry* 400, 134073.
- Fu, Z., Wu, M., Han, X., & Xu, L. (2017). Effect of okara dietary fiber on the properties of starch-based films. *Starch/Staerke*, 69(11–12), 1–7. <https://doi.org/10.1002/star.201700053>
- Fuentes, A. P. C., Genevois, C. E., Flores, S. K., & de Escalada Pla, M. F. (2020). Valorisation of soy by-products as substrate for food ingredients containing *L. casei* through solid state fermentation. *LWT*, 132, 109779.
- Galicia-García, T., Martínez-Bustos, F., Jiménez-Arévalo, O. A., Arencón, D., Gámez-Pérez, J., & Martínez, A. B. (2012). Films of native and modified starch reinforced with fiber: Influence of some extrusion variables using response surface methodology. *Journal of Applied Polymer Science*, 126(S1), E327-E336.
- Gallo, L., & Jagus, R. (2006). Modelling *Saccharomyces cerevisiae* inactivation by natamycin in liquid cheese whey. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9(4), 311–316.
- García, M., Martino, M., & Zaritzky, N. (2000). Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch*, 52, 118–124.
- Garcia-Valle, D. E., Agama-Acevedo, E., del Carmen Nuñez-Santiago, M., Alvarez-Ramirez, J., & Bello-Pérez, L. A. (2021). Extrusion pregelatinization improves texture, viscoelasticity and in vitro starch digestibility of mango and amaranth flours. *Journal of Functional Foods*, 80, 104441.
- Ge, L., Zhu, M., Xu, Y., Li, X., Li, D., & Mu, C. (2017). Development of antimicrobial and controlled biodegradable gelatin-based edible films containing nisin and amino-functionalized montmorillonite. *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), 1727-1736.
- Genevois, C.E., Grenóvero, M.S. & de Escalada Pla, M.F. Use of different proportions of rice milling fractions as strategy for improving quality parameters

- and nutritional profile of gluten-free bread. *J Food Sci Technol* 58, 3913–3923 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04852-1>
- Gilfillan, W., Nguyen, D., Sopade, P., & Doherty, W. (2012). Preparation and characterisation of composites from starch and sugar cane fiber. *Industrial Crops and Products*, 40, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.036>
 - Gontard, N., & Guilbert, S. (1994). Biopackaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable materials of agricultural origin. In *Food Packaging and Preservation* (In M. Math., pp. 159–181). United Kingdom.
 - González-forte, L. S., Amalvy, J. I., Bertola, N., Amalvy, J. I., & Effect, N. B. (2018). Effect of natamycin on the physicochemical properties of corn starch based films and their effect on *Penicillium* spp . activity. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 0(0), 1–12.
 - González-Seligra, P., Guz, L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., & Famá, L. (2017). Influence of extrusion process conditions on starch film morphology. *Lwt*, 84, 520-528.
 - Gul, O., Saricaoglu, F. T., Besir, A., Atalar, I., & Yazici, F. (2018). Effect of ultrasound treatment on the properties of nano-emulsion films obtained from hazelnut meal protein and clove essential oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 466–474.
 - Gutiérrez, T., & Alvarez, V. (2017). Cellulosic materials as natural fillers in starch-containing matrix-based films: a review. *Polymer Bulletin*, 74(6), 2401-2430. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1814-0>
 - Hager, J. V, Rawles, S. D., Xiong, Y. L., Newman, M. C., & Webster, C. D. (2019). Edible Corn-zein-based Coating Incorporated with Nisin or Lemongrass Essential Oil Inhibits *Listeria monocytogenes* on Cultured Hybrid Striped Bass , *Morone chrysops* × *Morone saxatilis* , Fillets During Refrigerated and Frozen Storage, 50(1), 204–218.
 - Hanušová, K., Šťastná, M., Votavová, L., Klaudivová, K., Dobiáš, J., Voldřich, M., & Marek, M. (2010). Polymer films releasing nisin and/or natamycin from polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering*, 99(4), 491–496.
 - Hasan, M. U., Riaz, R., Malik, A. U., Khan, A. S., Anwar, R., Rehman, R. N. U., & Ali, S. (2021). Potential of Aloe vera gel coating for storage life extension

- and quality conservation of fruits and vegetables: An overview. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4), e13640.
- Hawkes, P. W., & Spence, J. C. (Eds.). (2019). *Springer handbook of microscopy* (pp. 1064-1071). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
 - Hazrati, K. Z., Sapuan, S. M., Zuhri, M. Y. M., & Jumaidin, R. (2021). Effect of plasticizers on physical, thermal, and tensile properties of thermoplastic films based on *Dioscorea hispida* starch. *International journal of biological macromolecules*, 185, 219-228.
 - Hernández-García, E., Vargas, M., & Chiralt, A. (2021). Thermoprocessed starch-polyester bilayer films as affected by the addition of gellan or xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 113, 106509.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.075>
 - <https://inta.gob.ar/documentos/calidad-de-la-soja-procesada-y-del-expeller-producido-por-la-industria-de-extrusado-prensado-en-argentina>
 - Hunter, L. (2000). No Title. *Applications Notes*, 12(5), 1–8.
 - Hutchings, J. B. (1999). Instrumental specification. *Food colour and appearance*. Springer 199–237.
 - Jafarzadeh, S., Nafchi, A. M., Salehabadi, A., Oladzad-Abbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102405.
 - Jagus, R. J., Gerschenson, L. N., & Ollé Resa, C. P. (2016). Combinational approaches for antimicrobial packaging: natamycin and nisin. In *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 599–608).
 - Jancy, S., Shruthy, R., & Preetha, R. (2020). Fabrication of packaging film reinforced with cellulose nanoparticles synthesised from jack fruit non-edible part using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 142, 63-72.
 - Jha, P., Dharmalingam, K., Nishizu, T., Katsuno, N., & Anandalakshmi, R. (2020). Effect of amylose–amylopectin ratios on physical, mechanical, and

thermal properties of starch-based bionanocomposite films incorporated with CMC and nanoclay. *Starch-Stärke*, 72(1-2), 1900121.

- Jiménez, A., Fabra, M., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.009>
- Juan N.A., Massigoge J.I., Errasquin L., Mendez J.M, Ochandio D.C., Alejandro Eduardo Saavedra A.E., Paolilli M.C., Alladio R.M., Accoroni C., Behr E.F. (2016). Quality of the processed soybeans and expeller produced by the extrusion-pressing industry in Argentina. INTI report.
- Kaewtatip, K., & Thongmee, J. (2012). Studies on the structure and properties of thermoplastic starch/luffa fiber composites. *Materials and Design*, 40, 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2012.03.053> ISSN 0261-3069
- Kalpanadevi, C., Singh, V., & Subramanian, R. (2018). Influence of milling on the nutritional composition of bran from different rice varieties. *Journal of food science and technology*, 55(6), 2259-2269. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3143-9>
- Kargarzadeh, H., Johar, N., & Ahmad, I. (2017). Starch biocomposite film reinforced by multiscale rice husk fiber. *Composites Science and Technology*, 151, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2017.08.018>
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1088–1094.
- Kocabaş, D. S., Akçelik, M. E., Bahçegül, E., & Özbek, H. N. (2021). Bulgur bran as a biopolymer source: Production and characterization of nanocellulose-reinforced hemicellulose-based biodegradable films with decreased water solubility. *Industrial Crops and Products*, 171, 113847.
- Koontz, J. L., Marcy, J. E., Barbeau, W. E., & Duncan, S. E. (2003). Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7111–7114.
- Krochta, J., & De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Journal of Food Technology*, 51(2), 61–74.

- Kuciel, S., & Liber-Knec, A. (2009). Biocomposites on the base of thermoplastic starch filled by wood and kenaf fiber. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(3), 269–274. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2009.1026>
- Kumar, V. A., Pravitha, M., Yadav, A., Pandiselvam, R., & Srivastav, P. P. (2023). Influence of ultrasonic application on soybean aqueous extract based composite edible film: Characterization and their food application. *Food Hydrocolloids*, 135, 108210.
- Kunte, L., Gennadios, A., Cuppett, S., Hanna, M., & Weller, C. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Journal of Cereal Chemistry*, 74, 115–118.
- La Fuente, C. I., do Val Siqueira, L., Augusto, P. E. D., & Tadini, C. C. (2022). Casting and extrusion processes to produce bio-based plastics using cassava starch modified by the dry heat treatment (DHT). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 75, 102906.
- Lafargue, D., Lourdin, D., & Doublier, J. (2007). Film-forming properties of a modified starch/ κ -carrageenan mixture in relation to its rheological behaviour. *Carbohydrate Polymers*, 70(1), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.03.019>
- Leistner, L., & Gould, G. (2002). *Hurdle technologies: combination treatments for food stability, safety and quality*. Springer.
- Li, X., & Farid, M. (2016). A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182, 33-45.
- Lim, G., Jang, S., & Song, K. (2010). Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract or thymol. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 415–420.
- Liu, Q., Wu, X., Qian, F., Zhang, T., & Mu, G. (2019). Influence of natamycin loading on the performance of transglutaminase-induced crosslinked gelatin composite films. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2425-2436.
- Lokuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified mandioca starch, native mandioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 928–935.

- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lucas, J. C., Quintero, V. D., & Cárdenas Valencia, C. A. (2013). Caracterización de harina y almidón obtenidos a partir de plátano guineo AAAea (*Musa sapientum* L.). *Acta Agronómica*, 62(2), 83-96.
- Luciano, C. G., Tessaro, L., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B., Fernandes, A. M., Moraes, I. C. F., & do Amaral Sobral, P. J. (2021). Effects of nisin concentration on properties of gelatin film-forming solutions and their films. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 587-599.
- Lück, E., & Jager, M. (1997). Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects. In E. Lück (Ed.), *Antimicrobial food additives* (pp. 35–197). New York: Springer-Verlag.
- Ludueña, L., Vázquez, A., & Alvarez, V. (2012). Effect of lignocellulosic filler type and content on the behavior of polycaprolactone based eco-composites for packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.064>
- Manley, M., Van Zyl, L., & Osborne, B. G. (2002). Using Fourier transform near infrared spectroscopy in determining kernel hardness, protein and moisture content of whole wheat flour. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(1), 71-76.
- Mannozi, C., Cecchini, J. P., Tylewicz, U., Siroli, L., Patrignani, F., Lanciotti, R., ... & Romani, S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 440-444.
- Mano, J., & Viana, J. (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.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Carmo Avides, M. D. O., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1884–1891.

- Meena, M., Prajapati, P., Ravichandran, C., & Sehrawat, R. (2021). Natamycin: a natural preservative for food applications—a review. *Food Science and Biotechnology*, 1-16.
- Meira, S. M. M., Zehetmeyer, G., Scheibel, J. M., Werner, J. O., & Brandelli, A. (2016). Starch-halloysite nanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 226–234.
- Menzel, C., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Vilaplana, F. (2019). Antioxidant starch films containing sunflower hull extracts. *Carbohydrate Polymers*, 214, 142-151.
- Menzel, C., Gonzalez-Martinez, C., Vilaplana, F., Diretto, G. and Chiralt, A. Incorporation of natural antioxidants from rice straw into renewable starch films (2020). *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 976-986.
- Merci, A.; Marim, R.G.; Urbano, A.; Mali, S. Films Based on Cassava Starch Reinforced with Soybean Hulls or Microcrystalline Cellulose from Soybean Hulls. *Food Packag. Shelf Life* 2019, 20, 100321.
- Miller K.S. and Krochta, J.M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 228-237.
- Moatsou, G., Moschopoulou, E., Beka, A., Tsermoula, P., & Pratsis, D. (2015). Effect of natamycin-containing coating on the evolution of biochemical and microbiological parameters during the ripening and storage of ovine hard-Gruyère-type cheese. *International Dairy Journal*, 50, 1–8.
- Moll, G. N., Clark, J., Chan, W. C., Bycroft, B. W., Roberts, G. C. K., Konings, W. N., & Driessen, A. J. M. (1997). Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. *Journal of Bacteriology*, 179, 135–140.
- Monroy, Y., Rivero, S., & García, M. A. (2018). Microstructural and techno-functional properties of cassava starch modified by ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 42, 795-804. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.12.048>
- Moreno, O., Pastor, C., Muller, J., Atarés, L., González, C., & Chiralt, A. (2014). Physical and bioactive properties of corn starch–Buttermilk edible films. *Journal of Food Engineering*, 141, 27–36.

- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., & Voilley, A. (2000). Temperature influence on moisture transfer through synthetic films. *Journal of Membrane Science*, 168, 223–231.
- Moro, T. M., Ascheri, J. L., Ortiz, J. A., Carvalho, C. W., & Meléndez-Arévalo, A. (2017). Bioplastics of native starches reinforced with passion fruit peel. *Food and Bioprocess Technology*, 10(10), 1798-1808.
- Naidu A. S.(2000). Lactoperoxidase. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu A. S. Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 103-132.
- Nandane, A. S., & Jain, R. K. (2018). Optimization of formulation and process parameters for soy protein-based edible film using response surface methodology. *Journal of Packaging Technology and Research*, 2(3), 203-210.
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Irvani, S., & Varma, R. S. (2021). Starch, cellulose, pectin, gum, alginate, chitin and chitosan derived (nano) materials for sustainable water treatment: A review. *Carbohydrate polymers*, 251, 116986.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2017, 5ta edición). *Food analysis* (p. 630). Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Niendorf, K., & Raeymaekers, B. (2021). Additive manufacturing of polymer matrix composite materials with aligned or organized filler material: a review. *Advanced Engineering Materials*, 23(4), 2001002.
- Ochoa-Yepes, O., Di Grogio, L., Goyanes, S., Mauri, A., & Famá, L. (2019). Influence of process (extrusion/thermo-compression, casteo) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films. *Carbohydrate polymers*, 208, 221-231.
- Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2013). Effect of natamycin on physical properties of starch edible films and their effect on *Saccharomyces cerevisiae* activity. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11), 3124-3133.
- Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, 146–151.
- Ollé Resa, C. P., Jagus, R. J., & Gerschenson, L. N. (2021). Do fillers improve the physicochemical properties of antimicrobial mandioca starch edible films? *Journal of Food Safety*, e12880. <https://doi.org/10.1111/jfs.12880>

- Ollé Resa, C., Gerschenson, L., & Jagus, R. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. *Food Control*, 59, 737–742.
- Ollé Resa, C., Jagus, R., & Gerschenson, L. (2014b). Effect of natamycin, nisin and Glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of mandioca starch edible films. *Materials Science and Engineering C*, 40, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.005>
- Ordóñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2021). Physicochemical and antimicrobial properties of cassava starch films with ferulic or cinnamic acid. *Lwt*, 144, 111242.
- Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022). Properties of PLA films with cinnamic acid: Effect of the processing method. *Food and Bioproducts Processing*, 133, 25-33.
- Ouadghiri, M., Amar, M., Daniel, H., & Swings, J. (2014). Yeasts in traditional Moroccan goat cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 8(32), 3029–3037.
- Pagella, C., Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2002). Characterization of starch based edible coatings. *Food and Bioproducts Processing*, 80(3), 193–198.
- Paolilli, M. C., Cabrini, S. M., Pagliaricci, L. O., Fillat, F. A., & Bitar, M. V. (2019). Importancia de la cadena de soja en Argentina. Ediciones INTA.
- Pérez, P. F., Resa, C. P. O., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2021). Addition of Zein for the Improvement of Physicochemical Properties of Antimicrobial Tapioca Starch Edible Film. *Food and Bioprocess Technology*, 1-10.
- Pintado, C. M., Ferreira, M. A., & Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.017>
- Pinto, M. S., de Carvalho, A. F., dos Santos Pires, A. C., Souza, A. A. C., da Silva, P. H. F., Sobral, D., ... & de Lima Santos, A. (2011). The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International dairy journal*, 21(2), 90-96.
- Prachayawarakorn, J., Chaiwatyothin, S., Mueangta, S., & Hanchana, A. (2013). Effect of jute and kapok fibers on properties of thermoplastic cassava starch

- composites. *Materials and Design*, 47, 309–315.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2012.12.012>
- Rahaman, A., Kumari, A., Zeng, X. A., Farooq, M. A., Siddique, R., Khalifa, I., ... & Manzoor, M. F. (2021). Ultrasound based modification and structural-functional analysis of corn and cassava starch. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, 105795.
 - Resa, C. P. O., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, 44, 146-151.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>.
 - Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2021). Preparation and incorporation of functional ingredients in edible films and coatings. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 209-231.
 - Robles-Flores, G. del C., Abud-Archila, M., Ventura-Canseco, L. M. C., Meza-Gordillo, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2018). Development and evaluation of a film and edible coating obtained from the *Cajanus cajan* seed applied to fresh strawberry fruit. *Food and Bioprocess Technology*, 11(12), 2172-2181.
 - Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438–447.
 - Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., de Vos, W. M., & Siezen, R. J. (1995). Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2873–2878.
 - Romero, V., Borneo, R., Passalacqua, N., & Aguirre, A. (2016). Biodegradable films obtained from triticale (x *Triticosecale*, Wittmack) flour activated with natamycin for cheese packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 54–59.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.09.003>
 - Rosello´-Soto E, Poojary MM, Barba FJ et al (2018) Thermal and nonthermal preservation techniques of tiger nuts’ beverage “horchata de chufa”. implications for food safety, nutritional and quality properties. *Food Res Int* 105:945–951. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.014>
 - Rosen, S. (1982). *Fundamental principles of polymeric materials*. New York.

- S. Maaran, R. Hoover, E. Donner, Q. Liu, Composition, structure, morphology and physicochemical properties of lablab bean, navy bean, rice bean, tepary bean and velvet bean starches, *Food Chemistry*, Volume 152, 2014, Pages 491-499, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.014>.
- Shia, D. and Hui, C.Y. (1998) An Interface Model for the Prediction of Young's Modulus of Layered Silicate-Elastomer Nanocomposites. *Polymer composites*, Vol. 19, 608-617. <https://doi.org/10.1002/pc.10134>
- Shiroodi, S. G., Nesaei, S., Ovissipour, M., Al-Qadiri, H. M., Rasco, B., & Sablani, S. (2016). Biodegradable polymeric films incorporated with nisin: characterization and efficiency against *Listeria monocytogenes*. *Food and Bioprocess Technology*, 9(6), 958-969.
- Silva, V. D. M., Macedo, M. C. C., Rodrigues, C. G., dos Santos, A. N., e Loyola, A. C. D. F., & Fante, C. A. (2020). Biodegradable edible films of ripe banana peel and starch enriched with extract of *Eriobotrya japonica* leaves. *Food Bioscience*, 38, 100750.
- Singh, S., & Shalini, R. (2016). Effect of hurdle technology in food preservation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 641-649.
- Sluka (2016)
- Smid, E. J., & Gorris, L. G. (2020). Natural antimicrobials for food preservation. In *Handbook of food preservation* (pp. 283-298). CRC Press
- Sokal, R., & Rohlf, J. (2000). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco, California: W. H. Freeman and Company.
- Somboonsub, S., & Thawornchinsombut, S. (2015). Effect of rice bran protein and cassava starch ratio on physical, mechanical and structural properties of rice bran protein-cassava starch composite film. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*, 1(1), 63–67. ISSN: 2408-1736
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., & Kapoor, A. (2021). Food preservation techniques and nanotechnology for increased shelf life of fruits, vegetables, beverages and spices: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 1715-1735.
- Stoll, L., Silva, A. M. D., Iahnke, A. O. E. S., Costa, T. M. H., Flores, S. H., & Rios, A. D. O. (2017). Active biodegradable film with encapsulated

- anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13218.
- Šupová, M., Martynková, G. S., & Barabaszová, K. (2011). Effect of nanofillers dispersion in polymer matrices: a review. *Science of advanced materials*, 3(1), 1-25.
 - Tajarudin, H. A., & Ng, C. W. C. (2022). Biocoating from Composite Materials. In *Biocoating for Fertilizer Industry* (pp. 9-23). Singapore: Springer Nature Singapore.
 - Te Welscher, Y. M., Jones, L., van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., De Kruijff, B., Eitzen, G., & Breukink, E. (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2618–2625.
 - Te Welscher, Y. M., Ten Napel, H. H., Balagué, M. M., Souza, C. M., Riezman, H., De Kruijff, B., & Breukink, E. (2008). Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6393–6401.
 - Teixeira, G. H. D. A., Morelli, L., Ma, S., Stewart, A., & O'Keefe, S. F. (2019). Photoprotective effect of mycosporine-like aminoacids extracts on natamycin, saffron carotenoids and epigallocatechin gallate in acidified beverages exposed to different light sources. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(2), 440-450.
 - Thomas, L. V, Clarkson, M. R., & Delves-Broughton, J. (2000). Nisin. *Boca Raton: Natural Food Antimicrobial Systems* (pp 463–524).
 - Tiwari, B., Valdramidis, V., O'Donnell, C., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987–6000.
 - Toro-Márquez, L. A., Merino, D., & Gutiérrez, T. J. (2018). Bionanocomposite films prepared from corn starch with and without nanopackaged Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) flower extract. *Food and Bioprocess Technology*, 11(11), 1955-1973.
 - Trezza, T., & Krochta, J. (2000). Color Stability of Edible Coatings During Prolonged Storage. *Journal of Food Science*, 65(1), 1166–1169.

- Valdés, A., Ramos, M., Beltrán, A., Jiménez, A., & Garrigós, M. (2017). State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications, 7(56), 1–23.
- Valencia-Sullca, C., Atarés, L., Vargas, M., & Chiralt, A. (2018). Physical and antimicrobial properties of compression-molded cassava starch-chitosan films for meat preservation. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1339-1349
- Valero, M. F. (2013). In-vitro degradation of thermoplastic polyurethane and starch modified. *Polímeros*, 23, 373-382.
- Van Soest, J. J., Tournois, H., de Wit, D., & Vliegthart, J. F. (1995). Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 279, 201-214.
- Vartiainen, J., Vähä-Nissi, M., & Harlin, A. (2014). Biopolymer films and coatings in packaging applications—a review of recent developments. *Materials Sciences and applications*, 2014.
- Vásconez, M., Flores, S., Campos, C., Alvarado, , & Gerschenson, L. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–mandioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.026>
- Versino, F., & García, M. A. (2014). Cassava (*Manihot esculenta*) starch films reinforced with natural fibrous filler. *Industrial Crops & Products*, 58, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.040>
- Vicentini N. M., Dupuy N., Leitzelman M., Cereda M. P. & Sobral P. J. A. (2005). Prediction of Cassava Starch Edible Film Properties by Chemometric Analysis of Infrared Spectra, *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 38:6, 749-767. <http://dx.doi.org/10.1080/00387010500316080>
- Wan, J., Liu, C., Liu, W., Tu, Z., Wu, W., & Tan, H. (2015). Optimization of instant edible films based on dietary fiber processed with dynamic high pressure microfluidization for barrier properties and water solubility. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.032>

- Wang, S. Y., Zhan, L., Xi, H. F., Bruhns, O. T., & Xiao, H. (2019). Hencky strain and logarithmic rate for unified approach to constitutive modeling of continua. *State of the Art and Future Trends in Material Modeling*, 443-484.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch retrogradation: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568-585. doi: 10.1111/1541-4337.12143
- Yan, X., Diao, M., Yu, Y., Gao, F., Wang, E., Wang, Z., & Zhang, T. (2021). Influence of esterification and ultrasound treatment on formation and properties of starch nanoparticles and their impact as a filler on chitosan based films characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 154-160.
- Yang, L., & Paulson, A. (2000). Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Research International*, 33, 563–570.
- Yangilar, F. (2017). Effects of natamycin edible films fortified with essential oils on the safety and quality parameters of Kashar cheese. *Food Safety*.
- Yangilar, F., & Oğuzhan Yildiz, P. (2016). Casein / natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological , chemical and sensory properties during the ripening of Kashar. *Society of Chemical Industry*, 96(7), 2328–2336.
- Zainuddin, S., Ahmad, I., Kargarzadeh, H., Abdullah, I., & Dufresne, A. (2013). Potential of using multiscale kenaf fibers as reinforcing filler in cassava starch-kenaf biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 2299–2305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11>.