



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

*Trabajo de Tesis Doctoral*

**DESARROLLO DE MATRICES POLIMÉRICAS  
ACTIVAS PARA LA PRESERVACIÓN Y EXTENSIÓN  
DE LA VIDA ÚTIL DE QUESOS Y DERIVADOS**

---

*Lic. Lucía del Sol González Forte*

*Director: Dr. Javier I. Amalvy*

*Co-directora: Dra. Nora Bertola*

**2017**

*El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT-CIC-CONICET CCT La Plata, La Plata, Argentina) y el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA - CONICET CCT La Plata - UNLP, La Plata, Argentina).*

*A Miriam N. Martino,  
por iniciarme en el camino de la investigación.  
Sé que nos cuidás desde arriba.*

## Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis:

Al Dr. Javier Amalvy, mi director de Tesis, por acompañarme siempre en este camino, incluso en los momentos más difíciles; por sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por los consejos de la vida y el tiempo dedicado para que pueda cumplir este objetivo.

A la Dra. Nora Bértola, mi co-directora, quien se animó a sumarse a este proyecto en un momento complejo, aportando sus conocimientos y experiencia.

Al Dr. Roberto Romagnoli y al Dr. Roberto Salvarezza por haberme permitido llevar a cabo este trabajo de investigación en las instalaciones del CIDEPINT y del INIFTA, respectivamente.

A la Dra. Noemí Zaritzky por permitirme realizar parte de los ensayos del presente trabajo en las instalaciones del CIDCA.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico recibido sin el cual no podría haberse realizado este trabajo.

A Daniel Russo por la asistencia técnica en los ensayos de propiedades mecánicas.

Al Dr. Enso Reinoso, Verónica Amor y Mauricio Melis por la ayuda en los ensayos microbiológicos.

A Lore, Martín y Marie por su apoyo, ayuda y amistad incondicional.

A Oscar, Fran, Pao, Andrés y Rodri por su agradable compañía, apoyo, mates y charlas a lo largo de estos años juntos.

A los chicos del 3º piso del INIFTA por los momentos de trabajo y de relax.

A todos mis compañeros durante mi actividad docente en la UNLP, de las cátedras de Fenómenos de Transporte, Diseño de Experimentos y Agroindustrias/Productos Lácteos.

*A Diego, mi compañero, por bancarme en todas y ser mi inspiración.*

*A mi familia por el apoyo incondicional, la paciencia y comprensión: Amy, Guille, Lau, Loli, Amapola, Fermi.*

*A mis amigos, todos y cada uno, por su paciencia, aguante y cariño.*

**...gracias!!!**



## **RESUMEN**

En la actualidad, existe una tendencia creciente de utilizar polímeros naturales por las características de ser renovables, biocompatibles, biodegradables y en muchos casos económicamente viables en aplicaciones varias. En particular los almidones provenientes de diferentes fuentes han sido empleados para elaborar recubrimientos para alimentos. Sin embargo requieren de la adición de plastificantes para reducir la rigidez y tendencia al agrietado. Una práctica común es la incorporación de glicerol, alcohol polivinílico (PVA) o combinaciones de ellos. La plastificación por glicerol es temporaria y puede migrar hacia el alimento. El PVA, por su parte, es un polímero de amplio uso en la industria por ser no-tóxico, soluble en agua, biocompatible y biodegradable, con resistencia química y alta flexibilidad, así como buenas propiedades de barrera para el oxígeno y los aromas. Sin embargo, la plastificación empleando PVA como único plastificante requiere de la incorporación de cantidades importantes, que supera en algunos casos el 50 % p/p.

La incorporación de agentes específicos a la formulación de un recubrimiento o envase modifica la funcionalidad transformándolo en película activa o en envase activo, ampliando su condición de “extender la vida útil del producto” a “mejorar la seguridad y propiedades sensoriales del producto manteniendo su calidad”.

Por otra parte, la compleja composición de los quesos y las condiciones ambientales durante el procesamiento y almacenamiento, promueven el desarrollo de mohos y bacterias en la superficie, reduciendo considerablemente la calidad de los mismos, y conformando un riesgo para la salud por la potencial generación de toxinas que pueden migrar a la masa del queso.

En este trabajo de investigación se propuso el reemplazo de parte del PVA por un poliuretano de muy baja temperatura de transición vítrea, de tal manera que pudiera actuar como plastificante en pequeñas cantidades o proporciones, logrando películas conteniendo como mínimo 70 % p/p de almidón. Posteriormente las formulaciones fueron adicionadas con antioxidantes y antimicrobianos y se evaluaron las propiedades físico-químicas, mecánicas y de superficie de las películas comparadas con películas sin aditar. En particular se

evaluó la actividad antimicrobiana en placa frente a cultivos específicos aislados de la superficie de quesos en salas de maduración y se realizaron ensayos del desempeño en sistemas reales. Las películas conteniendo poliuretano presentaron una mejora en sus propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua, y cuando se les adicionó natamicina como agente antifúngico resultaron eficientes para proteger la superficie de quesos frente a la contaminación externa durante la etapa de maduración.

# ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
RESUMEN	1
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u></b>	10
1.1. Materiales plásticos sintéticos	10
1.2. Bioplásticos	11
1.3. Almidón	13
1.3.1. <u>Gelatinización</u>	17
1.4. Plastificantes	18
1.4.1. <u>Alcohol polivinílico (PVA)</u>	19
1.4.2. <u>Poliuretano</u>	20
1.4.2.1. <i>Química de los poliuretanos</i>	23
1.5. Productos lácteos – Quesos	25
1.5.1. <u>Aspectos microbiológicos de la seguridad alimentaria</u>	26
1.5.2. <u>Micotoxinas</u>	27
1.6. Aditivos	29
1.6.1. <u>Aditivos antioxidantes</u>	29
1.6.1.1. <i>ButilHidroxitolueno (BHT)</i>	30
1.6.1.2. <i>α-Tocoferol</i>	31
1.6.2. <u>Aditivos antifúngicos</u>	32
1.6.2.1. <i>Sorbato de Potasio</i>	32
1.6.2.2. <i>Natamicina</i>	33
1.6.2.2.1. <i>Aplicación de natamicina en alimentos</i>	35
<b>2. OBJETIVOS</b>	37
<b>3. <u>PELÍCULAS COMPUESTAS. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BASE Y ADITIVADAS</u></b>	38
3.1. Introducción	38
3.2. Objetivos	39
3.3. Materiales	39

<b>3.4. Síntesis de las dispersiones poliuretánicas</b>	40
3.4.1. <u>Síntesis del prepolímero</u>	40
3.4.2. <u>Síntesis del prepolímero con grupos vinílicos terminales</u>	41
3.4.3. <u>Neutralización</u>	41
3.4.4. <u>Dispersión en agua</u>	42
3.4.5. <u>Síntesis de dispersión poliuretánica polimerizada</u>	42
<b>3.5. Preparación de las películas</b>	43
3.5.1. <u>Gelatinización del almidón</u>	43
3.5.2. <u>Solubilización del alcohol polivinílico (PVA)</u>	44
3.5.3. <u>Obtención de las películas</u>	44
3.5.4. <u>Evaluación de un tratamiento térmico de las películas (“curado”)</u>	45
3.5.5. <u>Adición de los compuestos activos</u>	45
3.5.5.1. <i>Incorporación de antioxidantes</i>	45
3.5.5.2. <i>Incorporación de antifúngicos</i>	46
<b>3.6. Caracterización de las películas</b>	46
3.6.1. <u>Contenido de sólidos de la dispersión acuosa poliuretánica</u>	46
3.6.2. <u>Contenido de humedad de las películas</u>	47
3.6.3. <u>Grado de hinchamiento</u>	47
3.6.4. <u>Espesor de las películas</u>	47
3.6.5. <u>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Modo transmisión y ATR</u>	48
3.6.6. <u>Espectroscopía UV-Visible</u>	50
3.6.7. <u>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</u>	50
3.6.8. <u>Propiedades térmicas</u>	51
3.6.8.1. <i>Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)</i>	51
3.6.8.2. <i>Termogravimetría (TGA)</i>	51
3.6.9. <u>Permeabilidad al vapor de agua (WVP)</u>	52
3.6.10. <u>Análisis de difracción de rayos X (DRX)</u>	53
3.6.11. <u>Propiedades mecánicas de tracción</u>	54
3.6.11.1. <i>Ensayos mediante texturómetro</i>	54
3.6.11.2. <i>Ensayos mediante Análisis Mecánico Dinámico</i>	54
<b>3.7. Análisis estadístico</b>	54
<b>3.8. Resultados y discusión</b>	55
3.8.1. <u>Películas base</u>	55
3.8.1.1. <i>Obtención de las películas</i>	55
3.8.1.2. <i>Evaluación de un tratamiento térmico de las películas (“curado”)</i>	58
3.8.1.3. <i>Caracterización de las películas</i>	58

3.8.1.3.1. <i>Contenido de humedad y espesor de las películas</i>	58
3.8.1.3.2. <i>Grado de hinchamiento en el equilibrio</i>	59
3.8.1.3.3. <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Modo transmisión y ATR</i>	60
3.8.1.3.4. <i>Espectrometría UV-Visible</i>	66
3.8.1.3.5. <i>Propiedades térmicas</i>	67
3.8.1.3.5.1. <i>Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)</i>	67
3.8.1.3.5.2. <i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	69
3.8.1.3.6. <i>Análisis de difracción de rayos-X (DRX)</i>	70
3.8.1.3.7. <i>Propiedades mecánicas</i>	72
3.8.1.2.7.1. <i>Con texturómetro</i>	72
3.8.1.2.7.2. <i>Con Análisis Dinámico Mecánico</i>	74
3.8.1.3.8. <i>Permeabilidad al vapor de agua (WVP)</i>	78
3.8.1.3.9. <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	79
3.8.2. <u><i>Películas aditivadas con antioxidantes</i></u>	80
3.8.2.1. <i>Incorporación de aditivos</i>	81
3.8.2.2. <i>Propiedades mecánicas</i>	82
3.8.2.2.1. <i>Con texturómetro</i>	82
3.8.2.3. <i>Espectroscopia FT-IR</i>	87
3.8.3. <u><i>Películas aditivadas con antifúngicos</i></u>	89
3.8.3.1. <i>Películas aditivadas con sorbato de potasio</i>	89
3.8.3.2. <i>Películas aditivadas con natamicina</i>	89
3.8.3.2.1. <i>Contenido de humedad</i>	90
3.8.3.2.2. <i>Grado de hinchamiento en el equilibrio</i>	91
3.8.3.2.3. <i>Espectroscopia FT-IR. Modo ATR</i>	92
3.8.3.2.4. <i>Espectrofotometría UV</i>	96
3.8.3.2.5. <i>Propiedades térmicas</i>	98
3.8.3.2.5.1. <i>Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)</i>	98
3.8.3.2.5.2. <i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	99
3.8.3.2.6. <i>Análisis de difracción de rayos-X</i>	100
3.8.3.2.7. <i>Propiedades mecánicas</i>	103
3.8.3.2.7.1. <i>Con texturómetro</i>	103
3.8.3.2.8. <i>Permeabilidad al vapor de agua (WVP)</i>	107
3.8.3.2.9. <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	107
<b>3.9. Conclusiones parciales</b>	<b>110</b>
<b>4. <u>ENSAYOS EN SISTEMAS SIMULADOS Y REALES.</u></b>	
<u><b>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS</b></u>	<b>111</b>

<b>4.1. Introducción</b>	111
4.1.1. <u>Migración en alimentos</u>	111
4.1.2. <u>Cuantificación de la migración</u>	113
4.1.3. <u>Clasificación de alimentos, simulantes y condiciones de ensayo</u>	113
<b>4.2. Objetivos</b>	116
<b>4.3. Materiales y métodos</b>	116
4.3.1. <u>Materiales</u>	116
4.3.2. <u>Ensayos en películas</u>	116
4.3.2.1. <i>Absorción de isooctano</i>	116
4.3.2.2. <i>Evaluación de la capacidad antioxidante de películas activas</i>	116
4.3.2.3. <i>Estudio de la distribución de natamicina en ambas caras de la película</i>	117
4.3.3. <u>Aplicación de recubrimientos activos sobre quesos</u>	117
4.3.3.1. <i>Espesor de recubrimiento aplicado a queso</i>	118
4.3.3.2. <i>Ensayo de difusión de natamicina</i>	119
4.3.4. <u>Ensayos microbiológicos</u>	121
4.3.4.1. <i>Aislamiento de colonias de <i>Penicillium spp</i> de quesos</i>	121
4.3.4.2. <i>Estudio de sensibilidad de las películas frente a <i>Penicillium spp</i></i>	122
4.3.4.3. <i>Evaluación de la capacidad antimicrobiana (antimicogramas)</i>	123
4.3.4.4. <i>Evaluación de desempeño antifúngico de películas cargadas con natamicina</i>	124
4.3.5. <u>Ensayo de conservación de queso en condiciones de maduración</u>	124
<b>4.4. Análisis estadístico</b>	125
<b>4.5. Resultados y Discusión</b>	125
4.5.1. <u>Ensayos en películas</u>	125
4.5.1.1. <i>Absorción de isooctano</i>	125
4.5.1.2. <i>Evaluación de la capacidad antioxidante de películas activas</i>	126
4.5.1.3. <i>Estudio de la distribución de natamicina en ambas caras de la película</i>	131
4.5.2. <u>Aplicación de recubrimientos activos sobre quesos</u>	135
4.5.2.1. <i>Espesor de recubrimiento</i>	136
4.5.2.2. <i>Ensayo de difusión de natamicina hacia la masa de queso semiduro</i>	137
4.5.3. <u>Ensayos microbiológicos</u>	139

4.5.3.1. <i>Aislamiento de cepas</i>	139
4.5.3.2. <i>Estudio de sensibilidad de las películas frente a <i>Penicillium spp</i></i>	140
4.5.3.3. <i>Evaluación de la capacidad antimicrobiana (antimicogramas)</i>	143
4.5.3.4. <i>Evaluación de desempeño antifúngico de películas cargadas con natamicina</i>	146
4.5.4. <u>Ensayo de conservación de queso en condiciones de maduración</u>	149
4.5.4.1. <i>Con natamicina al 1 % p/p en las formulaciones.</i>	150
4.5.4.2. <i>Con natamicina al 0,1 % p/p en las formulaciones</i>	154
4.5.4.3. <i>Discusión de resultados</i>	156
<b>4.6. Conclusiones parciales</b>	158
<b>5. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u></b>	160
<b>6. <u>TRABAJOS FUTUROS</u></b>	161
<b>7. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	162
<b>8. <u>LISTADO DE FIGURAS y TABLAS</u></b>	177

*La edad es algo que no importa,  
a menos que usted sea un queso.*

Luis Buñuel



# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **1.1. Materiales plásticos sintéticos**

En general, existe una amplia gama de materiales que se utilizan en envasado, incluyendo metal, vidrio, papel, plásticos o una combinación de más de un material como materiales compuestos (Davis y Song, 2006). Sin embargo, luego de la Segunda Guerra Mundial, y como consecuencia de los desarrollos tecnológicos alcanzados para satisfacer las necesidades logísticas del conflicto, se generalizó el uso de los envases plásticos en alimentos (Dangaran y col., 2009; Sun, 2005a).

Desde entonces y hasta hoy en día, los materiales plásticos derivados del petróleo, tales como polietilentereftalato (PET), policloruro de vinilo (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS), son los materiales que principalmente se han utilizado para el envasado de alimentos (Siracusa y col., 2008). Su uso se extendió debido a las numerosas ventajas que ofrecen, en particular su disponibilidad a gran escala y relativo bajo costo, además de su buena performance mecánica, relativamente buenas propiedades de barrera, bajo peso, transparencia, durabilidad, sellabilidad y resistencia a agentes microbiológicos (Arrieta y col., 2011; Ruban, 2009; Siracusa y col., 2008).

Teniendo en cuenta la velocidad a la que se agotan los recursos naturales, los polímeros sintéticos se han convertido en una solución inteligente, pero más allá de sus beneficios, el empleo masivo de estos plásticos sintéticos trae algunos inconvenientes:

- a) el impacto ambiental producido a lo largo de su ciclo de vida en el que debe considerarse el consumo total de materias primas no renovables, la energía proveniente de recursos fósiles consumida en la producción y transporte, las emisiones de gases que contribuyen al efecto invernadero ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) (Zhang y Mittal, 2010);
- b) su incierta disponibilidad y precio futuro; al ser el petróleo un recurso no renovable, la evolución y producción sostenida de estos materiales está condicionada y por ende se estima que su precio continuará incrementándose;

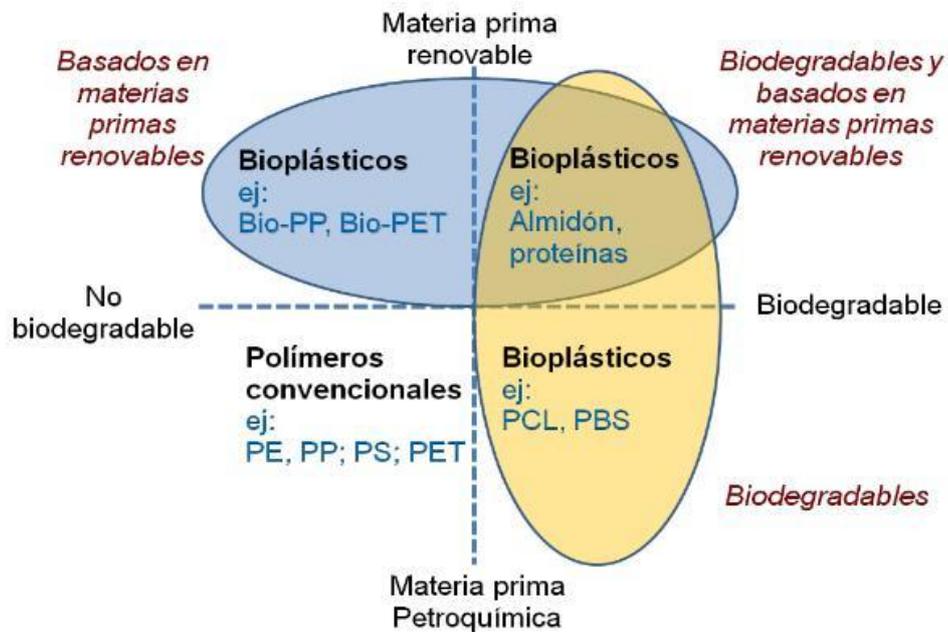
c) en general, los materiales plásticos sintéticos son altamente resistentes a la degradación, lo que conlleva a que se acumulen sobre la superficie terrestre, constituyendo un serio problema ambiental mundial relacionado con la contaminación del aire y fuentes de agua, entre otros (Hernández Silva y Guzmán Martínez, 2009). Algunas posibles soluciones a este problema podrían ser acumularlos en lugares específicos, incinerarlos o reciclarlos (Weber y col., 2002). La acumulación en lugares específicos no es una solución real, además de que, con el crecimiento de la sociedad, se hace difícil encontrar lugares para acumularlos. La incineración de los plásticos produce una gran cantidad de CO<sub>2</sub>, favoreciendo el calentamiento global, y en ocasiones produce gases tóxicos que también contribuyen a la contaminación ambiental (Song y col., 2011). Si bien el reciclado sería la opción más amigable con el medio ambiente, requiere mucho trabajo y energía, ya que implica remover los plásticos, clasificarlos, lavarlos, secarlos, triturarlos y luego reprocesarlos, y en consecuencia el proceso en muchos casos no es rentable (Marsh y Bugusu, 2007; SinhaRay y Bousmina 2005).

Estas problemáticas muestran claramente que resulta prioritario desarrollar materiales poliméricos alternativos que no impliquen el uso de componentes tóxicos o nocivos en su fabricación, y que puedan reemplazar a los sintéticos al menos en algunas aplicaciones. Por estas razones, desde las últimas décadas el desarrollo de materiales biodegradables ha sido un gran desafío (Cruz-Romero y col., 2008; Petersen y col., 1999; Sinha Ray y Bousmina, 2005; Siracusa y col., 2008; Sorrentino y col., 2007; Zhang y Mittal, 2010).

## **1.2. Bioplásticos**

De acuerdo a la asociación “European Bioplastics” el término *bioplástico* incluye polímeros biodegradables con biodegradabilidad probada según norma (European-Bioplastics, 2012). Por lo tanto, los bioplásticos pueden dividirse en tres categorías (Figura 1.1):

- Derivados de recursos renovables / no biodegradables
- Derivados de recursos renovables / biodegradables
- Sintéticos / biodegradables



**Figura 1.1.** Definición de bioplásticos: división según su biodegradabilidad y origen de la materia prima (European-Bioplastics, 2012).

El hecho de que un material se obtenga a partir de recursos renovables no implica necesariamente que sea biodegradable, y viceversa. La combinación de ambas características es lo que hace al gran interés en esta área. Los *bioplásticos basados en recursos renovables* antes mencionados son a la vez biodegradables y renovables. Se pueden clasificar en tres categorías de acuerdo con el método de producción:

- *Polímeros producidos por síntesis química clásica a partir de monómeros naturales:* entre estos polímeros, los más estudiados son: el ácido poliláctico (PLA), preparado a partir de la polimerización de ácido láctico que se produce por la fermentación de hidratos de carbono; y el ácido poliglicólico (PGA) sintetizado a partir de ácido glicólico. Desde un punto de vista comercial, el PLA es un material interesante ya que tiene buenas propiedades mecánicas, es transparente y biodegradable; sin embargo, el nivel de producción industrial es costoso en comparación con los materiales termoplásticos más utilizados (Bohlmann, 2005; van Tuil y col., 2000).
- *Polímeros producidos por microorganismos tal como se encuentran en la naturaleza o bacterias modificadas genéticamente:* este grupo está constituido por

los poliésteres producidos por una amplia variedad de microorganismos como fuente de almacenamiento de carbono y energía (Suriyamongkol y col., 2007). Entre ellos, los polímeros más conocidos son los polihidroxialcanoatos, entre los cuales los más estudiados son los polihidroxitiratos (PHB). Hay otros polímeros producidos por microorganismos que están siendo estudiados en la actualidad, tales como la celulosa bacteriana, entre otros. Es de destacar que los costos de producción de estos polímeros son todavía altos.

- *Biopolímeros naturales*: esta categoría comprende los polisacáridos (derivados de celulosa, alginato, pectina, almidón, quitosano, carragenina, agar y gomas), ligninas y proteínas (proteína de soja, trigo, gluten de trigo, zeína de maíz, gelatina, suero de leche, caseína y queratina, entre otros) que son de origen vegetal o animal. Todos estos compuestos contienen enlaces hidrolizables, una propiedad que los hace muy susceptibles a la biodegradación por las enzimas hidrolíticas que producen los microorganismos. Esta característica tiene un gran impacto en el rendimiento y la durabilidad de estos materiales cuando se almacenan en condiciones de alta humedad (Song y Zheng, 2014).

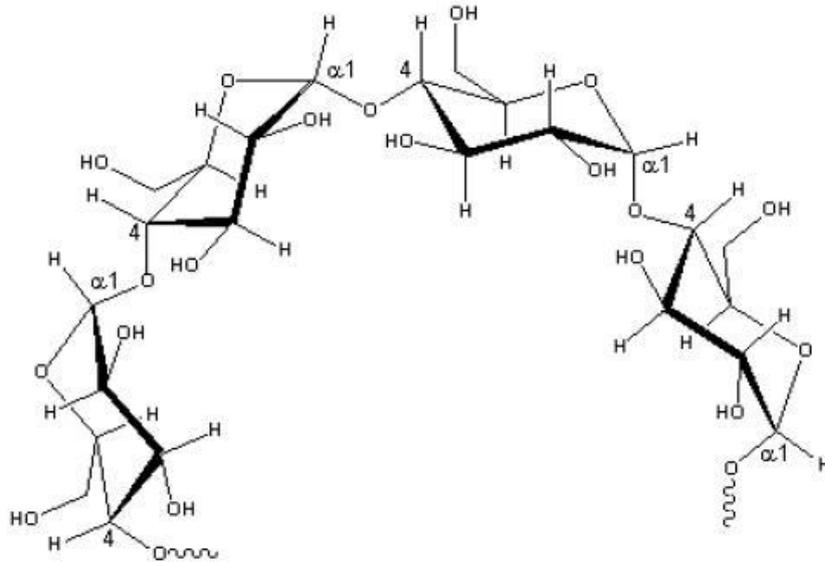
### **1.3. Almidón**

El almidón es el segundo componente en orden de abundancia en la naturaleza después de la celulosa y tiene aplicaciones en diversas industrias (alimenticia, farmacéutica, textil y papelera). Los almidones constituyen, a su vez, un componente mayoritario en el consumo humano, aportando entre el 75 y 80 % del consumo energético total.

El estudio y la evaluación de las características y propiedades funcionales de este polisacárido son necesarios para poder sugerir posibles usos y aplicaciones industriales del mismo. Dentro de las posibles aplicaciones del almidón en la industria alimenticia podemos mencionar los siguientes: ligante, estabilizante de espumas, gelificante, glaseante, humectante, texturizante y espesante.

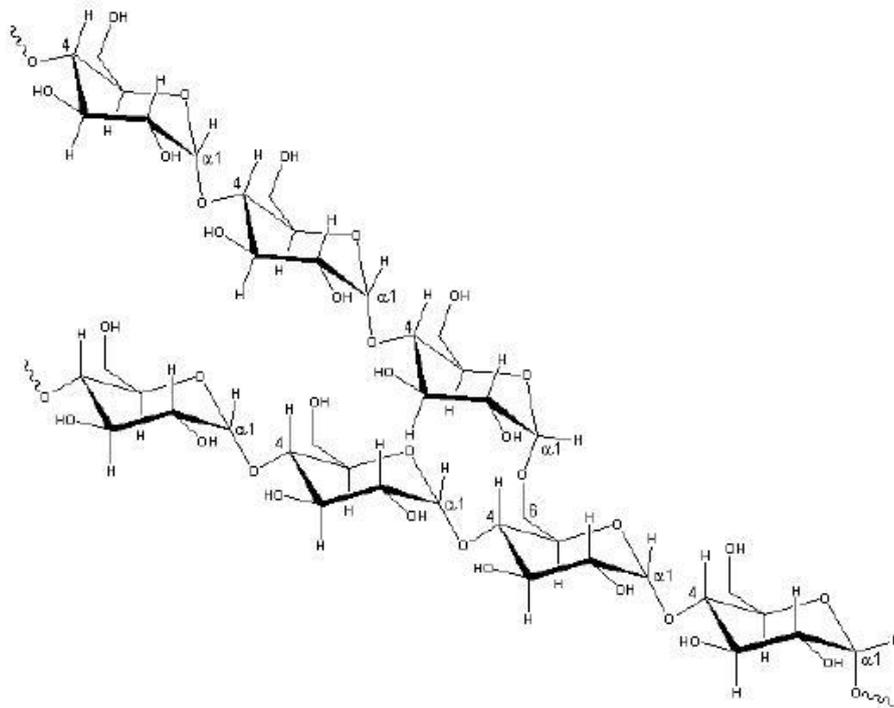
El almidón está formado por dos tipos de moléculas: la amilosa, de estructura lineal, que se encuentra generalmente en un porcentaje de entre 20 y 30 %; y la amilopectina, de estructura ramificada, cuyo porcentaje varía del 70 al

80 %; las proporciones de amilosa y amilopectina dependen de la fuente vegetal. Es un polisacárido de reserva energética de los vegetales y se localiza principalmente en raíces, tubérculos, frutas y semillas. En los tejidos vegetales se presenta en entidades discretas, semicristalinas, las cuales reciben el nombre de gránulos. El tamaño, forma y estructura de los gránulos difieren sustancialmente con la fuente botánica. Su forma es variada: esféricos o con forma de discos para los de trigo, poliédricos en arroz y maíz, con forma alargada en papa, filamentosos en almidón de maíz de alto contenido de amilosa, etc. (Whistler y col., 2009). A pesar de que el almidón está compuesto fundamentalmente por amilosa y amilopectina, los gránulos también contienen trazas de otros constituyentes como lípidos polares, nitrógeno y fósforo, en forma de fosfolípidos, que, en muchas ocasiones, juegan un rol importante en las propiedades funcionales del almidón (Belitz y Grosch, 1997). La relación amilosa/amilopectina y su organización física dentro de la estructura granular, le confieren a los almidones propiedades fisicoquímicas y funcionales características (Bello-Pérez, 1985). La amilosa (Figura 1.2) se compone principalmente de cadenas de restos de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Aunque se admite que se trata de un polímero lineal, existe una pequeña proporción de ramificaciones por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (Thomas y Atwell, 1999). El peso molecular varía entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  Da y puede contener entre 500 y 6000 unidades de glucosa. La naturaleza lineal y de gran longitud le confiere a la amilosa algunas propiedades únicas, como por ejemplo su capacidad para formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos y su tendencia a asociarse consigo misma, precipitando de la solución. Cuando se enfría, la amilosa presenta una fuerte tendencia a la retrogradación, donde cristaliza formando geles de almidón, aumentando así la viscosidad de la solución.



**Figura 1.2.** Estructura química de la amilosa.

La amilopectina (Figura 1.3) está formada por  $\alpha$ -D-glucosa, concatenada fundamentalmente por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). Está mucho más ramificada que la amilosa, con un 4-5 % de enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Se encuentra en una proporción de 70-80 % y en ciertos casos alcanza niveles de hasta 98-99 %, dependiendo de la fuente botánica del almidón (Zobel, 1988). Su estructura y proporción en el almidón contribuyen notablemente a las propiedades funcionales del mismo (Bello-Pérez y col., 2002). El peso molecular es del orden de  $7 \times 10^7$  y  $5,7 \times 10^9$  Da (Whistler y col., 2009), con aproximadamente 600.000 restos de glucosa y se encuentra ramificada al azar. Posee una alta viscosidad intrínseca debido a su estructura ramificada y su alto peso molecular. Por calentamiento en agua, proporciona soluciones claras y de alta viscosidad, que son cohesivas. Sus soluciones no tienen casi tendencia a la retrogradación, tampoco presentan envejecimiento ni formación de gel, aunque la concentración de las mismas sea muy elevada.



**Figura 1.3** Estructura química de la amilopectina.

Los gránulos de almidón son anisotrópicos debido a la presencia de regiones cristalinas en una masa predominantemente amorfa, dando como resultado el fenómeno de birrefringencia y que a la luz polarizada se evidencie como una cruz de malta (Katz y col., 1993).

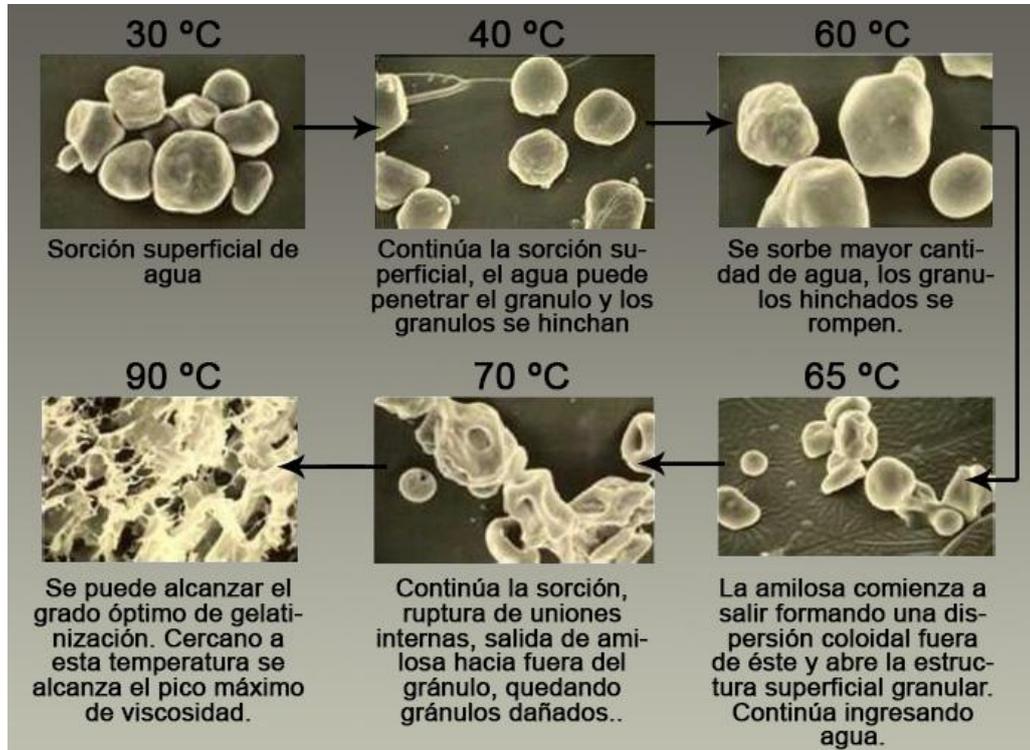
La región cristalina del almidón está formada por cadenas de racimos de la amilopectina mientras que la región amorfa por puntos ramificados de la amilopectina y por la amilosa (Zobel, 1988). La región cristalina ha sido la más estudiada, junto con la estructura de los gránulos de almidón y el arreglo de sus componentes, ya que permiten explicar las propiedades fisicoquímicas y funcionales, como así también la digestibilidad de los diferentes almidones.

Para el desarrollo de películas biodegradables, el almidón ha recibido una considerable atención debido a su naturaleza totalmente biodegradable, buena capacidad formadora de películas y bajo costo (Arvanitoyannis y col., 1998; Arvanitoyannis y Biliaderis, 1999; García y col., 2000; Liu, 2005; Lourdin y col., 1997; van Soest y Essers, 1997). De acuerdo a García y col. (1998) la amilosa es la responsable de formar una estructura adecuada para las películas basadas en

almidón. La estructura ramificada de la amilopectina generalmente conlleva a películas con pobres propiedades mecánicas (Tharanathan, 2003).

### 1.3.1. Gelatinización

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría, pero se hinchan cuando se calientan en un medio acuoso. Inicialmente el hinchamiento es reversible y las propiedades ópticas del gránulo no se pierden; sin embargo cuando se alcanza una cierta temperatura, el hinchamiento llega a ser irreversible afectando la estructura del gránulo (Fanelli, 2009). Este proceso es conocido como gelatinización y ocurre en un intervalo de temperatura, ya que los gránulos presentan diferente resistencia debido a su composición y grado de cristalinidad. La gelatinización es un proceso endotérmico que va acompañada de la lixiviación de la amilosa y pérdida de la birrefringencia del gránulo. Al final de este fenómeno se genera una pasta en la que existen cadenas de amilosa de bajo peso molecular altamente hidratadas que rodean a los restos de los gránulos, también hidratados (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Evolución de los gránulos de almidón de maíz a lo largo del proceso de gelatinización.

La intensidad de gelatinización depende de la fuente botánica de la que proviene el almidón, del contenido de humedad de la muestra y de ciertas condiciones experimentales tales como pH, presencia de sólidos, etc. (Huang y Rooney, 2001).

#### **1.4. Plastificantes**

Los plastificantes son una clase importante de compuestos, en general de bajo peso molecular, que se utilizan ampliamente como aditivos en industrias de polímeros (Sejidov y col., 2005). El Consejo de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) define un plastificante como “una sustancia o material incorporado en otro material (por lo general un plástico o elastómero) para aumentar su flexibilidad”. Estas sustancias reducen la tensión de deformación, la dureza, la densidad y la viscosidad de un polímero, y al mismo tiempo aumentan la flexibilidad de la cadena del mismo, la resistencia a la fractura y la constante dieléctrica (Rosen, 1982). Otras propiedades físicas también se ven afectadas, tales como el grado de cristalinidad, la claridad óptica, la conductividad eléctrica, el comportamiento frente al fuego y la resistencia a la degradación biológica (Białecka-Florjan y Florjan, 2007).

Generalmente estos compuestos presentan pesos moleculares entre 300 y 600 Da, con cadenas de carbono lineales o cíclicas (14-40 carbonos) (Greener y Fennema, 1993). El bajo peso molecular de un plastificante permite que este ocupe los espacios intermoleculares entre las cadenas de polímero, cambiando su organización molecular tridimensional, reduciendo la energía necesaria para el movimiento molecular y la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas del polímero. Como consecuencia, se genera un aumento en el volumen libre y, por lo tanto, en la movilidad molecular (Wypych, 2004). Por lo tanto, el grado de plasticidad de los polímeros depende en gran medida de la estructura química del plastificante, incluyendo su composición química, peso molecular y grupos funcionales presentes (Moreno, 1992). En función de estas propiedades, un cambio en el tipo de plastificante afectará las propiedades de flexibilidad finales del producto (Cao y col., 2009).

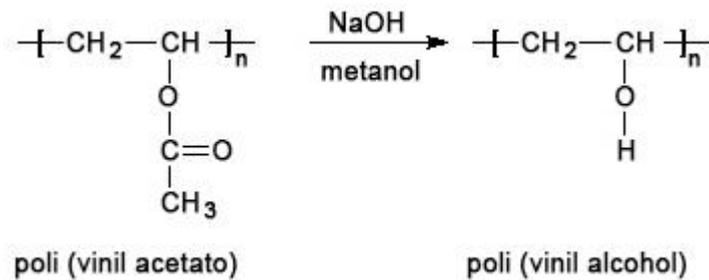
Existen plastificantes *internos*, que son aquellos que se copolimerizan o se hacen reaccionar con el polímero; y plastificantes *externos*, que son sustancias de bajo peso molecular y que no se encuentran anclados. Por este motivo, los plastificantes externos pueden perderse por evaporación, migración o extracción. Las más utilizadas dentro de estas sustancias son el glicerol, el sorbitol, el xilitol y los aceites naturales (Gurgel Adeodato Vieira y col., 2011).

En particular, las películas de almidón tienden a ser frágiles y quebradizas. Usualmente es necesario agregar plastificantes para mejorar las propiedades mecánicas del material final. Varios plastificantes externos, por lo general polioles, se han utilizado ampliamente para la formulación de películas comestibles, siendo el glicerol uno de los más estudiados (Araujo-Farroa y col., 2010). Es un plastificante hidrófilo, y cuando se añade en la proporción correcta puede reducir las fuerzas intermoleculares y aumentar la movilidad de las cadenas del polímero (Ghasemlou y col., 2011). Algunos autores que estudiaron el uso de glicerol como plastificante del almidón, encontraron que a mayor intensidad de los enlaces de hidrógeno entre el almidón y el plastificante, también se puede observar que se dificulta la recristalización del almidón durante el almacenamiento (Spychaj y col., 2007).

Sin embargo, en el caso particular del glicerol, la plastificación es temporaria y puede migrar hacia el alimento y perderse; es por esto que hoy en día se continúa en la búsqueda de alternativas para plastificar materiales como el almidón, mezclándolo con otros polímeros sintéticos (Briassoulis, 2004; Santayanon y Wootthikanokkhan, 2003).

#### 1.4.1. Alcohol polivinílico (PVA)

El alcohol polivinílico (PVOH, PVA, o PVal), también llamado polietenol o poli (alcohol vinílico), es un polímero sintético soluble en agua, de fórmula química general  $(C_2H_4O)_n$ , que se obtiene por hidrólisis del poliacetato de vinilo como muestra la Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Obtención de alcohol polivinílico a partir de poli (vinil acetato).

El alcohol polivinílico tiene excelentes propiedades para formar películas, como emulsionante y como adhesivo. También es resistente al aceite, grasas y disolventes. Es inodoro y no tóxico, tiene alta resistencia y flexibilidad, así como alta propiedades de barrera para el oxígeno y los aromas, aunque estas propiedades dependen de la humedad (Saxena, 2004). El agua, que actúa como un plastificante, reducirá su resistencia a la tracción pero aumentará su elongación y resistencia al desgarro. El PVA es totalmente degradable y se disuelve rápidamente. De todas maneras, sus propiedades son influenciadas por el grado de hidrólisis y el peso molecular; a mayor grado de hidrólisis presenta mayor resistencia al agua (Peppas y Merrill, 1977). El PVA tiene un punto de fusión de 230 °C y un rango de 180-190 °C para los grados totalmente hidrolizado y parcialmente hidrolizado, respectivamente. Se descompone rápidamente por encima de 200°C. El PVA no funde como un termoplástico, sino que se descompone por pérdida de agua de dos grupos hidroxilos adyacentes a temperaturas superiores a 150 °C. Los enlaces dobles permanecen en la cadena y, a medida que se forman más en posiciones conjugadas, tiene lugar una coloración importante (Barrera y col., 2007). EL PVA ha sido reconocido como uno de los pocos polímeros sintéticos que pueden biodegradarse en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

#### 1.4.2. Poliuretano

Existen polímeros de alto peso molecular que también pueden actuar como plastificantes (Dong y col., 2013; Kaseem y col., 2012; Ran y col., 2003) y debido

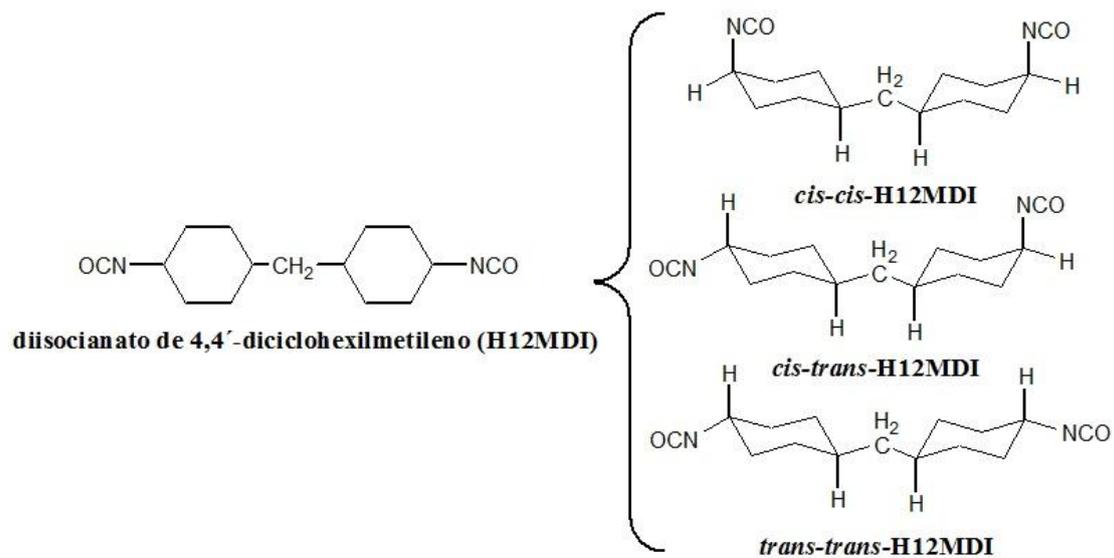
a la baja movilidad que éstos presentan, el proceso de migración se ve reducido (Pedersen y col., 2008).

El Código Alimentario Argentino (CAA), acepta la utilización de poliuretanos como materiales para entrar en contacto con alimentos, fijando un valor Límite de composición (LC) de 1 ppm de isocianato libre y estableciendo los monómeros permitidos para la fabricación de estos materiales poliméricos.

Los diisocianatos que están aprobados para su uso en envases y utensilios para entrar en contacto con alimentos son los siguientes:

- 1-isocianato-3-isocianatometil-3,5,5-trimetilciclohexano (diisocianato de isoforona, IPDI)
- 4,4'-di-isocianato de dicitlohexilmetano (H<sub>12</sub>MDI)
- 4,4'-di-isocianato de 3,3'-dimetil difenilo (TODI)
- 4,4'-di-isocianato de éter difenílico
- 2,4'-di-isocianato de difenilmetano (MDI)
- 4,4'-di-isocianato de difenilmetano (MDI)
- di-isocianato de hexametileno (HDI)
- 1,5-di-isocianato de naftaleno (NDI)
- 2,4-di-isocianato de toluleno (*p*-TDI)
- 2,6-di-isocianato de toluleno (*m*-TDI)
- 2,4-di-isocianato de toluleno, dimerizado

Dentro de los diisocianatos alifáticos, el IPDI y H<sub>12</sub>MDI son los más adecuados para su utilización como películas o recubrimientos debido a la gran transparencia y buenas propiedades mecánicas que presentan los mismos. En la Figura 1.6 se puede observar la estructura del H<sub>12</sub>MDI, isocianato seleccionado para este trabajo.



**Figura 1.6.** Estructura química del H<sub>12</sub>MDI.

Las dispersiones acuosas de poliuretano, cuya tecnología continúa en amplio desarrollo, se están volviendo cada vez más importantes desde su entrada al mercado internacional hace unos 35 años. Como muchos otros materiales poliméricos, los poliuretanos convencionales no son compatibles con el agua, por tal razón son necesarias algunas modificaciones en el proceso de producción de modo de hacer posible la generación de una dispersión acuosa. Además de un menor costo, las dispersiones acuosas de poliuretano, a diferencia de las formulaciones poliuretánicas tradicionales, son no-tóxicas, no-inflamables y no-contaminantes. Durante el proceso de secado solamente se evapora agua, contrario a lo que sucede con las formulaciones poliuretánicas diluidas en solventes orgánicos, en la cual los vapores liberados durante su aplicación son tóxicos, contaminantes e inflamables. Años atrás, el paso a grandes dimensiones de producción de poliuretano presentaba muchos inconvenientes, principalmente por la alta reactividad de los grupos isocianatos con varias impurezas, entre ellas el agua. Estas dificultades, sin embargo, se han superado en gran medida y el proceso puede ser controlado (Meincken y col., 2006). Dentro de las ventajas de estos materiales se incluyen una baja tasa de transmisión al vapor de agua, un buen control del tamaño de las partículas, excelentes propiedades de formación de película, estabilidad térmica, química y a la abrasión. Además, no son tóxicos y son “amigables” con el medio ambiente. Al poder ser sintetizados “a medida” para

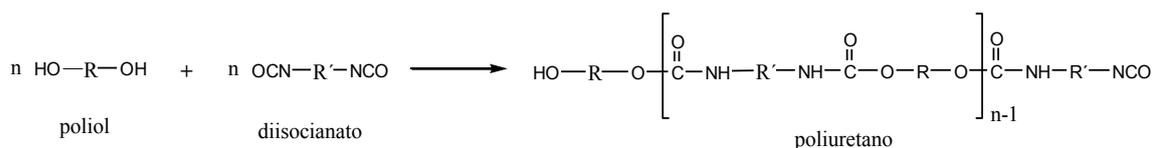
satisfacer demandas específicas, resulta un material muy interesante para el uso en la industria del envase en general y de alimentos en particular. A pesar de las excelentes propiedades de los poliuretanos dispersados en agua, no se han encontrado en el mercado envases con poliuretano en forma de película, ya sea como única película o formando parte de un multilaminado. Seguramente esto es debido a su alto costo, especialmente del componente isocianato, y por este motivo las últimas tendencias llevan a combinar poliuretano con materiales de bajo costo.

En cuanto al polioli que se emplea para la síntesis de dispersiones acuosas de poliuretano, se utilizan principalmente dioles del tipo poliéster o poliéter, aunque también pueden utilizarse otros polímeros hidroxilados tales como politioéteres, poliaminoésteres, poliacetales, policarbonatos, polisiloxanos, poliolefinas y polibutadieno di-hidroxilado.

Los poliuretanos a base de poliésteres presentan, en general, mayor resistencia a la abrasión, al calor y a los agentes químicos, aunque son más susceptibles a la degradación microbiológica. Los poliuretanos a base de poliéteres presentan menor costo, mayor flexibilidad a baja temperatura, mayor resiliencia, alta resistencia a la hidrólisis y mayor biocompatibilidad. Uno de los poliéteres más ampliamente utilizados en la síntesis de poliuretanos acuosos es el poli(propilenglicol) (PPG), el cual está presente en las listas positivas del CAA y es del tipo que se seleccionó para la realización de este trabajo.

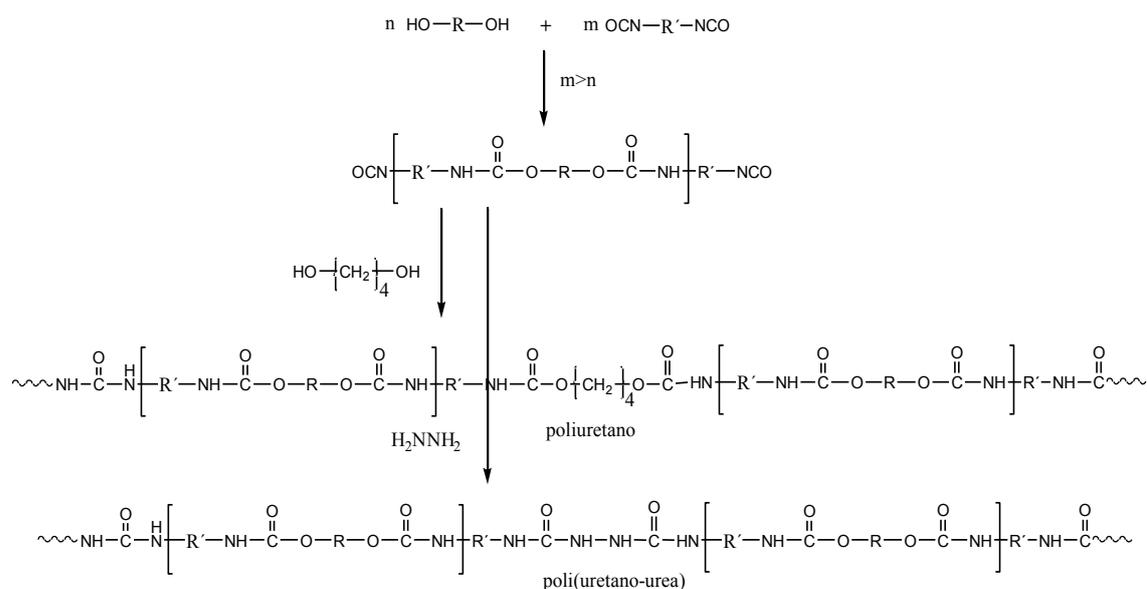
#### 1.4.2.1. Química de los poliuretanos

Los poliuretanos son sintetizados convencionalmente mediante una reacción de poliadición en etapas a partir de poliisocianatos y polioles. Estos compuestos deben tener una funcionalidad mayor o igual a dos y pueden ser moléculas discretas o polímeros. La unión de los mismos da lugar al llamado enlace uretano. La Figura 1.7 muestra una reacción general de obtención de un poliuretano lineal a partir de un diol y de un diisocianato.



**Figura 1.7.** Representación esquemática de la síntesis de un poliuretano.

Para tener un mejor control del sistema, generalmente se agrega un pequeño exceso de uno de los monómeros a fin de obtener un pre-polímero con cadenas más cortas, con grupos terminales  $-\text{NCO}$  u  $-\text{OH}$  reactivos. Luego, el peso molecular de las cadenas es aumentado a través de la unión sucesiva de estas, llevado a cabo por un agente denominado extensor de cadena. Este compuesto suele ser una molécula pequeña di o trifuncional. Si se utiliza un compuesto hidroxilado ( $-\text{OH}$ ), se obtendrá un poliuretano propiamente dicho, mientras que si se utiliza una amina ( $-\text{NH}_2$ ), el producto final será un poli(uretano-urea) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Representación esquemática de la síntesis de un poliuretano y de un poli(uretano-urea).

Algunos de los extensores pertenecientes a esta familia son hidrazina y una gran variedad de aminas que pueden ser alifáticas como etilendiamina, propilendiamina, butilendiamina, dietilentriamina y trietilentetramina; o cicloalifáticas como la ciclohexilendiamina, la isoforona diamina y la piperazina; y

aromáticas como fenilendiamina, toluendiamina y tetrametilxilendiamina. En el caso particular de este trabajo se seleccionó la etilendiamina (EDA) como extensor de cadena.

### **1.5. Productos lácteos - Quesos**

La producción del queso requiere de conocimientos técnicos específicos para controlar el crecimiento de los mohos, levaduras y bacterias que se inoculan en la leche y que poseen un papel importante en la obtención del sabor deseado, el aroma, la textura, el color, el aspecto y los elementos nutritivos del queso (Beresford y col., 2001; Irlinger y Mounier, 2009). Además de contener los microorganismos inoculados en la leche necesarios para su elaboración, la superficie de los quesos puede ser colonizada por otros microorganismos indeseables provenientes de una deficiente aplicación de buenas prácticas de manufactura durante el proceso, la maduración y el post-proceso. El crecimiento y las reacciones de oxidación microbiana que se producen en la superficie de los alimentos son dos de las principales causas de deterioro y pérdida de productos frescos y alimentos sólidos procesados (Var y col., 2006; Yangilar y Yildiz, 2016). Los microorganismos oportunistas no controlados generan mal sabor, mal olor, decoloración y en algunas ocasiones pueden producir compuestos secundarios tóxicos. Esto es inaceptable para la mayor parte de los consumidores y riesgoso, lo cual provoca un impacto negativo en la aceptación del producto (Lund y col., 2003). La presencia de estos microorganismos contaminantes en la superficie de quesos depende de los requerimientos específicos de cada uno, de las características del queso como pH, actividad acuosa ( $a_w$ ) y humedad y de la temperatura de almacenamiento (Welthagen y Viljoen, 1998).

En bibliografía se encuentran estudios de recubrimientos con propiedades antifúngicas o antimicrobianas por incorporación de agentes como lisozima, natamicina, nisina, EDTA, etc. Sin embargo la incorporación de antimicrobianos por spray o inmersión sin una matriz que retarde y controle la cantidad del agente activo podría perjudicar o modificar los proceso deseables durante la maduración del queso (Fajardo, 2003). De allí los beneficios de incorporar estos componentes en matrices poliméricas que permitan una dosificación y liberación controlada

(Hanušová y col., 2010). Además, las matrices ayudan al actuar como barreras semipermeables a la humedad, al CO<sub>2</sub> y al O<sub>2</sub>, permitiendo la reducción de peso y modificando la velocidad de respiración del queso (Del Nobile y col., 2009; Sinigaglia y col., 2008). La posibilidad de controlar la formulación amplía las aplicaciones potenciales de los materiales naturales.

Otro fenómeno que se puede presentar durante la maduración de los quesos es la lipólisis, a través de la cual se generan rancidez y mal sabor en el queso, debido a la rotura de los triglicéridos por el efecto de la enzima lipasa sobre ácidos grasos y glicerina. Por otro lado, las enzimas proteolíticas, las cuales no son fácilmente afectadas por el calor, afectan a las proteínas y también pueden producir sabor no deseado y olor en el producto (Var y col., 2006).

#### 1.5.1. Aspectos microbiológicos de la seguridad alimentaria

La Academia Americana de Microbiología (American Academy of Microbiology: AAM), describió alimentos seguros como: “Todos aquellos alimentos que, si se manejan adecuadamente en todas las etapas de producción, de procesamiento y de distribución, es poco probable que causen una enfermedad o lesión” (AAM, 1999). La Organización Mundial de la Salud (OMS; World Health Organization: WHO) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization: FAO) definen alimento seguro como “aquel alimento que es libre de todos aquellos peligros, ya sean crónicos o agudos, que puedan hacer que los alimentos perjudiquen la salud del consumidor” (FAO, 2003). Hoy en día la seguridad alimentaria es una de las 11 prioridades de la OMS y sus miembros adoptaron una resolución enérgica que reconoce la seguridad alimentaria como un tópico esencial para la salud pública (WHO, 2001).

En el escenario de la seguridad alimentaria, el objetivo primario es garantizar la seguridad microbiológica. Los microorganismos han reemplazado a las adulteraciones químicas como el principal agente reconocido de intoxicación alimentaria en los últimos dos siglos. La situación se agrava debido a la gran cantidad de cambios a nivel internacional. Estos cambios incluyen el crecimiento exponencial de la población, la urbanización y los cambios en el estilo de vida, el consumo de alimentos mínimamente procesados listos para el consumo, el comercio internacional, el turismo internacional, y la escasez de agua potable en

algunos sectores del planeta. Los alimentos son un buen sustrato para el desarrollo y contaminación microbiana, los cuales son reconocidos por los cambios indeseables y el deterioro presentado. Un aspecto más serio de la contaminación microbiana es la posibilidad de riesgos graves para la salud humana debido a la presencia de posibles microorganismos patógenos y/o sus metabolitos tóxicos los cuales llevan a brotes de intoxicación alimentaria. Los agentes patógenos reconocidos y transmitidos por los alimentos incluyen parásitos multicelulares, protozoos, hongos, bacterias, y virus (Varadaraj, 2010).

### 1.5.2. Micotoxinas

Como se expresó anteriormente, los mohos pueden inducir un deterioro en el queso a través de lipasas y proteinasas, pero también se debe considerar que son una amenaza para la seguridad debido a su capacidad de producir micotoxinas (Lund y col., 1995). La contaminación por micotoxinas es más relevante aún si tenemos en cuenta que algunos mohos pueden producir toxinas a temperaturas entre -2 y 10 °C (Kivanç, 1990).

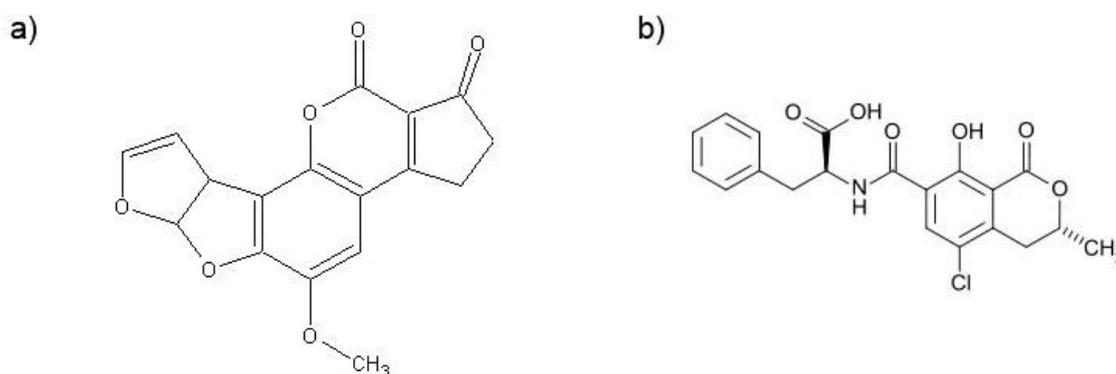
Se conocen como “micotoxinas” a las sustancias producidas por algunos hongos que son tóxicos tanto para el hombre como para los animales (FAO, 2003). Son metabolitos secundarios, por lo tanto, no son esenciales para el desarrollo del crecimiento del hongo, y generalmente poseen bajo peso molecular. Las micotoxinas se encuentran en diversos alimentos y piensos y se han relacionado con diversas enfermedades de animales y personas (Mayer, 1953; Coker, 1997). La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, con resultados que van desde la muerte a efectos nocivos en el sistema nervioso central, cardiovascular y respiratorio y en el aparato digestivo. Las micotoxinas pueden también ser agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores. Actualmente está muy extendida la opinión de que el efecto más importante de las micotoxinas, particularmente en los países en desarrollo, es la capacidad de algunas micotoxinas de obstaculizar la respuesta inmunitaria y, por consiguiente, de reducir la resistencia a enfermedades infecciosas.

Como se expuso anteriormente, los mohos y las levaduras sobre la cáscara del queso pueden presentarse como una gran amenaza para todas las variedades

de queso, pero sobre todo para quesos duros y semi-duros que son los que necesitan largos períodos de maduración. Las especies fúngicas no siempre pueden ser clasificadas como “tecnológicas” o “contaminantes”, dado que una misma especie puede ser utilizada para maduración y ser indeseable en otros casos (por ejemplo, *P. roqueforti* es la principal cepa para la maduración de queso azul, mientras que para otros quesos es contaminante) (Hymery y col., 2014).

A lo largo del período de maduración, la superficie de los quesos semi-duros o duros está cubierta por hongos, que forman una “alfombra” de textura acolchada. En general, la flora de hongos que se forma de manera espontánea es de naturaleza tóxica y se ha informado de que este tipo de hongos es peligroso para la salud (Bullerman, 1981; Leistner y Pitt, 1977). Dependiendo del tipo y sus características, las toxinas pueden encontrarse en la superficie, o también pueden penetrar en el interior. Por esta razón, la eliminación de la corteza no es eficaz, ya sea controlando su crecimiento mediante la limpieza de la superficie, o por el embalaje de queso en película o recubrimiento con cera de parafina.

Las micotoxinas más peligrosas que pueden encontrarse en quesos son la Ocratoxina A y la Aflatoxina M1 (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Estructura química de (a) Aflatoxina M1 y (b) Ocratoxina A

Ambas micotoxinas son producidas por especies de hongos indeseables ya sea por contaminación directa del queso o bien por contaminación indirecta de la leche que se utiliza para producir el queso a través de la contaminación en el pienso que comieron las vacas. Dentro de los posibles hongos contaminantes, el más problemático es *Penicillium spp* ya que se encuentra particularmente

adaptado para crecer sobre o dentro del queso. En la Figura 1.10 se muestra la superficie de un queso cubierto por mohos en una industria quesera durante la maduración.



**Figura 1.10.** Queso semi-duro en la sala de maduración de una quesería de la provincia de Buenos Aires, con crecimiento de mohos superficiales.

Por lo tanto, es esencial evitar y prevenir el crecimiento de microorganismos no deseados en las cámaras de maduración (Robinson, 1990; Scott, 1981). Se han hecho variados intentos para controlar el crecimiento de mohos en la superficie de quesos por impregnación del envoltorio o materiales con químicos fungicidas o fungistáticos (Hymery y col., 2014; Robinson, 1990; Sengun y col., 2008). Pero, por otro lado, debe considerarse que el tratamiento de los quesos durante la maduración para evitar o controlar el crecimiento fúngico en la superficie tiene un costo y volumen de trabajo elevado.

## **1.6. Aditivos**

### **1.6.1. Aditivos antioxidantes**

Una sustancia puede actuar como antioxidante en una variedad de formas, por ejemplo, por unión competitiva con el oxígeno, por retardo de la etapa de iniciación, por bloqueo de la propagación, destruyendo o uniendo radicales libres, por inhibición de los catalizadores, por estabilización de los hidroperóxidos, etc. Los compuestos antioxidantes pueden ser clasificados como primarios o secundarios, según la función que cumplan. Dentro del primer

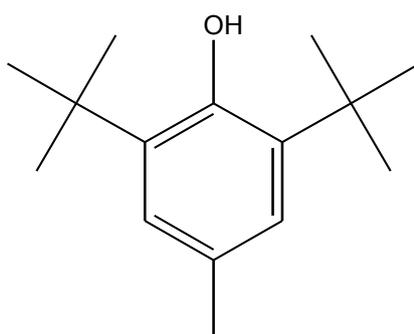
grupo se encuentran los fenoles impedidos, los cuales actúan como secuestrantes de oxígeno, dadores de hidrógeno o interrumpiendo las reacciones de propagación (Dopico-García y col., 2003).

Uno de los principales grupos de sustancias antioxidantes son los compuestos fenólicos naturales o sintéticos. Varios fenoles naturales (derivados del catecol, taninos, gosalol, ácido gálico) y los tocoferoles son poderosos antioxidantes. Los antioxidantes fenólicos sintéticos aprobados para su empleo en alimentos incluyen al butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propilo (PG) y terbutil hidroxiquinona (TBHQ).

#### 1.6.1.1. Butil Hidroxitolueno (BHT)

El 2,6-Di-ter-butil-p-cresol (butil hidroxitolueno o BHT), Figura 1.11 puede ser producido por dibutilación de p-cresol o la butilación en dos etapas de una mezcla de m-/p-cresol, incluyendo la separación por destilación fraccionada del BHT y el 4,6-Di-ter-butil-m-cresol. Por recrystalización se obtiene la pureza deseada, hasta el grado alimenticio (99,8 %).

El BHT es utilizado como antioxidante en muchas aplicaciones y en una gran variedad de industrias. Es un aditivo común en los combustibles provenientes del petróleo, en lubricantes, ceras, gomas naturales y sintéticas, pinturas, plásticos y elastómeros; a los cuales los protege de la oxidación durante la elaboración y el almacenamiento prolongado.



**Figura 1.11.** Estructura química del BHT

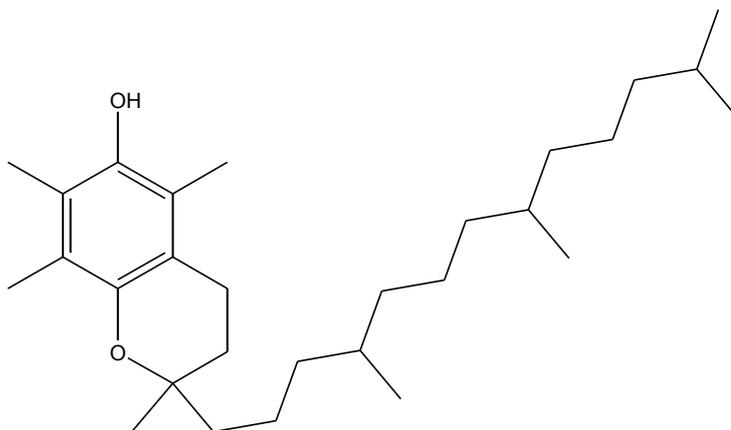
El BHT ha sido reconocido como aditivo alimenticio inocuo en la mayoría de los países. Se lo emplea en concentraciones de hasta 200 ppm sobre base de grasa, solo o en mezclas con BHA y TBHQ, aunque las regulaciones actuales

intentan disminuir su uso en la mayor medida posible y su reemplazo progresivo por sustancias naturales equivalentes.

#### 1.6.1.2. $\alpha$ -Tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es el compuesto mayoritario presente en la Vitamina E y, en algunos casos, los dos términos son utilizados como sinónimos. Está presente principalmente en una gran variedad de productos vegetales, pero también se lo encuentra en productos de origen animal. Presenta en su estructura (Figura 1.12) un anillo cromano (trimetilhidroquinona) y una cola que contiene cuatro unidades de isopreno, llamado grupo fitilo.

Como se mencionó anteriormente, la utilización de este compuesto en reemplazo de algunos antioxidantes sintéticos, se está volviendo una práctica cada vez más común, tanto en la industria alimenticia como en la de envases, debido a la excelente performance del  $\alpha$ -tocoferol durante el procesado de materiales plásticos.



**Figura 1.12.** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol

A primera vista hay cuatro diferencias principales entre el  $\alpha$ -tocoferol y el BHT que le confieren propiedades diferentes, tanto en sus propiedades físico-químicas como respecto a su acción antioxidante (Breese y col., 2000):

- \* El  $\alpha$ -tocoferol tiene una larga cola alifática, mientras que el BHT tiene solo un grupo metilo en posición *para* respecto del -OH.
- \* El  $\alpha$ -tocoferol tiene grupos metilenos (en lugar de grupos *t*-butilo en el BHT) que rodean el grupo -OH
- \* El  $\alpha$ -tocoferol tiene un oxígeno en posición *para* respecto del -OH

\* El  $\alpha$ -tocoferol está sustituido en las posiciones 3- y 5-.

### 1.6.2. Aditivos antifúngicos

La microestructura de los alimentos es un elemento clave para la elección de la forma de aplicación de un antimicrobiano. Corbo y col. (2009) proponen tres preguntas clave en relación a este tema:

- el alimento, ¿es líquido o sólido estructurado?
- en caso que el alimento fuera estructurado, ¿le gustaría que el antimicrobiano inhiba patógenos y/o destruya la microflora interna (aplicación interna) o en la superficie (aplicación externa)?
- ¿el antimicrobiano migra hacia el interior del alimento o no?

Las respuestas a estas preguntas son claves para elegir una aplicación externa o interna del antimicrobiano. La aplicación externa se utiliza para inhibir la microflora en la superficie o en el interior del producto, si el antimicrobiano tiene la capacidad de migrar.

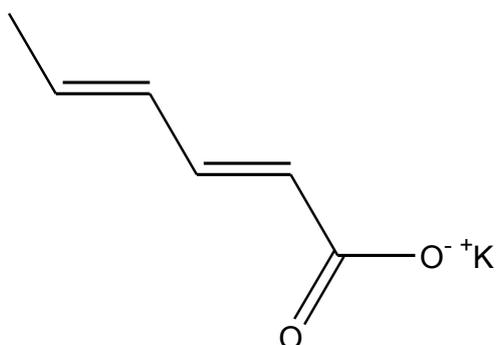
Si el agente antimicrobiano no migra y se desea inhibir el crecimiento de microorganismos en el interior del alimento, puede aplicarse durante la elaboración del alimento como un “ingrediente” adicional. Sin embargo, para la protección de la superficie de los alimentos existen distintas formas de aplicación externa, tales como inmersión del producto en una solución del antimicrobiano o aplicación directa del mismo sobre el alimento (Corbo y col., 2008; Del Nobile y col., 2009). Una alternativa más novedosa es la incorporación de los antimicrobianos en los envoltorios de los alimentos. Esta tecnología tiene la ventaja de poder liberar estos compuestos en forma controlada hacia el seno del alimento, protegiendo a los antimicrobianos de su interacción con componentes del mismo.

#### 1.6.2.1. Sorbato de potasio

El sorbato de potasio es uno de los conservantes de alimentos de uso más extendido. Se lo utiliza en productos lácteos, cárnicos, pescado y productos de panadería entre otros, como inhibidor de levaduras, hongos y bacterias. Es eficaz en la mayoría de los alimentos en un intervalo de concentraciones de 0,05-0,3 %

en peso. Aunque su actividad es mayor a bajos valores de pH, el sorbato de potasio es efectivo a valores de pH tan altos como 6.5.

La estructura química del Sorbato de K puede verse en la Figura 1.13. Es una cadena recta que presenta dos insaturaciones conjugadas en los carbonos 2 y 4.



**Figura 1.13.** Estructura química del sorbato de potasio.

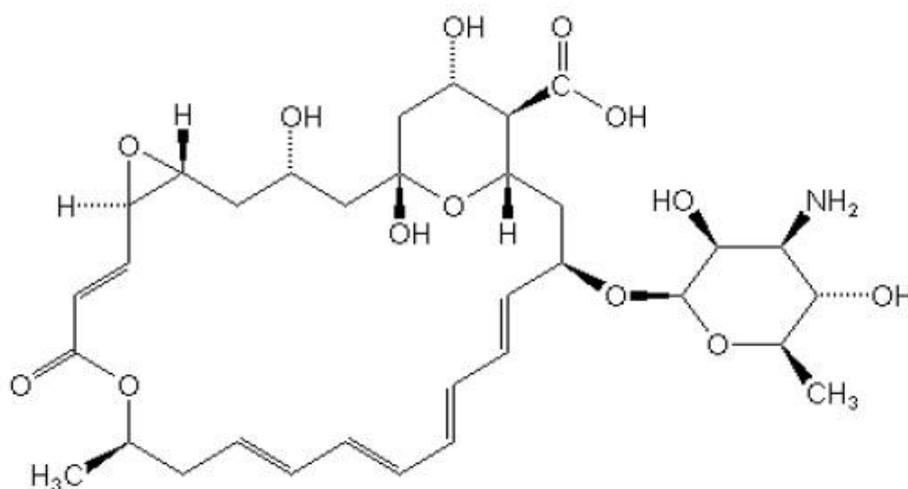
El sorbato de potasio es especialmente eficaz frente a hongos y levaduras, y también se ha demostrado su actividad frente a *Clostridium botulinum*, *Staphilococcus aureus* y *Salmonella spp.*

#### 1.6.2.2. Natamicina

La natamicina (también denominada pimaricina) es un miembro de la familia de los polienos, con una gran variedad de aplicaciones. Es producida por *Streptomyces natalensis* y se utiliza para el tratamiento tópico de las infecciones por hongos, y también en la industria alimentaria para evitar la contaminación de los productos con levaduras y mohos (Te Welscher y col., 2010). Se aplica para prevenir la contaminación de distintos alimentos, particularmente en quesos (Gallo y Jagus, 2006; El-Diasty y col., 2008). Es codificada como aditivo alimentario con el número 235.

En la Figura 1.14 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<sub>33</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>13</sub> (Capitan Vallvey,

2000). Presenta una ingesta diaria admitida (IDA) de 0-0,3 mg/kg de peso corporal/día (Hammond y Lambert, 1978).



**Figura 1.14.** Estructura química de la natamicina

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; Te Welscher y col., 2010). Es sabido que los esteroides tienen función estructural en la membrana de hongos y levaduras, y se piensa que residen en dominios específicos estando involucrados en procesos de endocitosis, exocitosis, fusión vacuolar (Wachtler y Balasubramanian, 2006), señalización de feromonas (Jin y col., 2008), compartimentalización de membranas (Klose y col., 2010), y el apropiado funcionamiento de las proteínas de membrana (Zhang y col., 2010). De acuerdo con Athar y Winner (1971), la modificación estructural y/o la disminución de la expresión del ergosterol disminuye sustancialmente la actividad fúngica de la natamicina *in vivo*. Te Welscher y col. (2010) observaron que, a través de la interacción específica con el ergosterol, la natamicina es capaz de interferir en las primeras instancias de fusión vacuolar. Durante esta fase se genera un reordenamiento de los diferentes complejos proteicos de las membranas. Por lo tanto, esto sugiere que el modo de acción de la natamicina es perturbar los reordenamientos de proteínas como resultado de su unión al ergosterol.

En la Tabla 1.1 se presenta la respuesta a la natamicina de distintos mohos y levaduras testeada *in vitro*.

El aumento de las infecciones fúngicas invasivas, especialmente en personas cuyos sistemas inmunológicos están comprometidos, es una creciente amenaza para la salud humana. Sólo unos pocos agentes antifúngicos demostraron ser eficaces, incluyendo polienos, fluorocitos, y derivados de los azoles, pero se ha observado un aumento en la resistencia a los antimicrobianos (Ghannoum y Rice, 1999). Sin embargo, la resistencia a los antibióticos poliénicos sigue siendo un fenómeno poco frecuente, lo que hace que estos compuestos sean particularmente útiles como agentes antifúngicos en alimentos (Te Welscher y col., 2010).

**Tabla 1.1.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la natamicina frente a distintos hongos. Adaptado de De Boer y Stolk-Horsthuis (1977).

<b>CMI (µg/ml)</b>	<b>Hongos</b>	<b>Levaduras</b>
<b>0,1-1,25</b>	<i>Byssochlamys fulva</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Gloeosporium álbum</i> <i>Sclerotinia fructicola</i> <i>Botritis spp.</i> <i>Fusarium solari</i>	<i>Candida spp.</i> <i>Dekkera spp.</i> <i>Saccharomyces spp.</i> <i>Hansenula polymorpha</i>
<b>4,0-8,0</b>	<i>Absidia spp.</i> <i>Alternaria spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>	<i>Zygosaccharomyces spp.</i> <i>Saccharomyces spp.</i> <i>Torulasporea rosei</i>
<b>10</b>	<i>Fusarium spp.</i>	

#### 1.6.2.2.1. Aplicación de natamicina en alimentos

La natamicina ha sido aprobada como aditivo alimentario en más de 40 países y es considerada como un producto GRAS por la FDA (Koontz y col.,

2003). A su vez es reconocida como conservante natural por la Unión Europea (CEE N°235).

En nuestro país, el CAA establece que la natamicina puede ser empleada para el tratamiento de cáscara de quesos de pasta dura o semi-dura 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/dm<sup>2</sup> 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. La natamicina podrá además ser empleada en los alimentos que específicamente permita su uso como sustancia antimicótica la Autoridad Sanitaria Nacional (CAA, 2014a; CAA, 2014b). El Codex Alimentario permite concentraciones máximas de natamicina diferentes al Código Alimentario Argentino; las mismas y los alimentos que pueden ser tratados con este antimicrobiano se muestran en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Aplicaciones de natamicina a distintos alimentos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentario, adaptado de WHO (2007).

<b>Tipo de alimento</b>	<b>Concentración máxima de natamicina permitida (mg/Kg)</b>
Análogos de quesos, quesos procesados, madurados o sin madurar, suero de queso	40
Carne triturada, curada y secada	20
Carne entera o cortada en pedazos	6

## **2. OBJETIVOS**

El **objetivo general** del presente trabajo de tesis fue preparar, caracterizar y emplear matrices poliméricas activas que permitan preservar y extender la vida útil de quesos y derivados, aportando funcionalidades específicas.

Los **objetivos específicos** de este trabajo fueron:

- ✓ Desarrollar películas a base de almidón de maíz con un contenido mínimo de 70 % p/p. Para lograr ese objetivo se empleó un poliuretano de muy baja temperatura de transición vítrea, capaz de una plastificación efectiva con el menor agregado posible. Se partió de una mezcla conteniendo 30 % p/p de alcohol polivinílico, para luego reemplazarlo parcialmente por el poliuretano, manteniendo el contenido de 70 % p/p de almidón.
- ✓ Incorporar aditivos a los sistemas ternarios utilizando compuestos de uso común en alimentos, y evaluando en primera instancia la factibilidad de incorporación. Este objetivo del trabajo contempló que las películas obtenidas estén de acuerdo con la legislación vigente, particularmente con lo expresado a nivel nacional en el Código Alimentario Argentino.
- ✓ Analizar en forma exhaustiva la microestructura de los productos obtenidos (con y sin aditivos) y su relación con las propiedades macroscópicas, caracterizándolos mediante diferentes técnicas como FT-IR, UV-visible, microscopía electrónica (SEM), DSC; y su funcionalidad por medidas de permeabilidad y comportamiento mecánico. En particular se evaluó el efecto de la incorporación de los aditivos en sus propiedades.
- ✓ Evaluar en el laboratorio la efectividad de las películas activas antimicrobianas frente a cepas de interés.
- ✓ Determinar la efectividad de los recubrimientos funcionales sobre un alimento de alto contenido graso (queso semiduro).

### **3. PELÍCULAS COMPUESTAS. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BASE Y ADITIVADAS**

#### **3.1. Introducción**

La obtención y caracterización de películas a base de almidones nativos de diversas fuentes biológicas ha sido ampliamente estudiada por diversos autores (Bertuzzi y col., 2007; Famá y col., 2005; Famá y col., 2006; Famá y col., 2007; Flores y col., 2010; García y col., 1998; García y col., 1999; García y col., 2000; Karam y col., 2005; Karam y col., 2006; López y col., 2008; López y col., 2010; López y col., 2011; Mali y col., 2002; Mali y col., 2004; Mali y col., 2005; Ollé Resa y col., 2013; Romero-Bastida y col., 2005; Shogren y col., 1993; ; Zhang y Han, 2006; Zhou y col., 2009). La naturaleza hidrofílica del almidón es la principal desventaja que limita el desarrollo de estos materiales; ya que muchas de sus propiedades dependen de la humedad ambiente (Shogren y col., 1993).

La combinación de almidón y alcohol polivinílico (PVA) es una de las mezclas biodegradables más comunes (Jayasekara y col., 2004; Khan y col., 2006). A pesar de sus propiedades ventajosas, la plastificación empleando PVA como único plastificante presenta el inconveniente de que se requiere la incorporación de cantidades importantes, que supera en algunos casos el 50 % p/p, con lo cual se han evaluado combinaciones de estos dos polímeros con un tercer polímero plastificante. En particular Sreekumar y col. (2012) estudiaron la plastificación de mezclas de almidón y alcohol polivinílico con glicerol, y encontraron que la cristalinidad de la mezcla disminuía, la temperatura de degradación era mayor, y que las propiedades mecánicas mejoraban. Más recientemente, Yu y col. (2015) encontraron que la compatibilidad entre el almidón y el PVA mejora cuando el almidón es tratado a 55 °C, modificando la fuerza de los enlaces.

Algunos investigadores han experimentado la plastificación de almidón con poliuretano: Wu y Zhang (2001) prepararon películas por termocompresión mezclando almidón termoplástico con un poliuretano de tipo poliéster de base acuosa a partir de 2,4-tolueno diisocianato (TDI), y observaron que las propiedades mecánicas y la resistencia al agua se veían significativamente

incrementadas cuando se utilizaba poliuretano entre 5 y 30 %. Lu y col. (2005) propusieron el uso de un poliuretano basado en diisocianato de isoforona para modificar un almidón plastificado con glicerol, y hallaron que cuando el contenido de poliuretano es menor al 20 %, se pueden mezclar con el almidón plastificado y que las propiedades mecánicas de esta mezcla se pueden atribuir a los enlaces de hidrógeno entre el almidón y el poliuretano. Karagoz y Ozkoc (2013), por su parte, utilizaron ácido poliláctico como plastificante y diisocianato de 1,4-fenileno como compatibilizante. En este caso, se mejoraron la homogeneidad de las mezclas y las interacciones interfaciales gracias al uso del compatibilizante.

### **3.2. Objetivos**

En este capítulo los objetivos fueron:

- estudiar la formación de películas compuestas por 70 % p/p de almidón, y el 30 %p/p restante por mezclas de PVA y PU en distintas proporciones.
- obtener películas activas aditivadas con antioxidantes o con antifúngicos.
- analizar las propiedades de los materiales obtenidos por diferentes técnicas, y estudiar el efecto del agregado de los aditivos sobre las mismas.

### **3.3. Materiales**

En esta sección del trabajo se utilizó almidón de maíz comercial (Maizena Duryea<sup>®</sup>, Unilever Argentina S. A.), conteniendo 0,11g de agua, 0,006g de lípidos, 0,003g de cenizas, 0,0078g de proteínas/g almidón, y una relación amilosa/amilopectina de 25/75 (base seca) (Ferrero y col., 1996). El alcohol polivinílico (PVA) fue utilizado en forma de polvo, con 98 % de hidrólisis y un rango de peso molecular ( $M_w$ ) entre 13.000 y 23.000 (Sigma Aldrich, EEUU). El poliuretano (PU) fue sintetizado a partir de 4,4'-di-isocianato de dicitclohexilmetano ( $H_{12}$ MDI, Desmodur W, Bayer) y polipropilenglicol,  $M_w$  2.000 (PPG 2000, Voranol 2120, Dow) siguiendo la técnica del prepolímero que se describe en la sección 3.4. También se utilizó etilendiamina (EDA, Sigma Aldrich, EEUU), dilaurato de dibutil estaño (DBTDL, Sigma Aldrich, EEUU) y metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, Sigma Aldrich, EEUU), todos de grado analítico. La trietilamina (TEA) fue provista por ADELFA S. A. y utilizada tal cual se recibió. Se utilizó ácido

dimetilolpropiónico (DMPA, Sigma Aldrich, EEUU), el cual fue secado antes de su uso a 100°C durante 2 horas en una estufa de vacío. Por último, se utilizó persulfato de amonio (APS) de grado analítico, tal cual se recibió.

### **3.4. Síntesis de la dispersión poliuretánica**

Se realizó la síntesis del polímero poliuretánico en base acuosa, según la técnica de síntesis descrita en trabajos previos del grupo (Amalvy, 2002; Pardini y Amalvy, 2008; Peruzzo y col., 2010). La misma se efectuó siguiendo las etapas detalladas a continuación.

#### **3.4.1. Síntesis del prepolímero**

Se utilizó un reactor cilíndrico de seis bocas con capacidad para 1000 ml de dispersión (Figura 3.1). El mismo se complementó con un agitador mecánico, termómetro, condensador, tubo para muestreo, jeringa para el burbujeo de gases y ampolla con compensación para el agregado de reactivos. Dentro del reactor y previa pesada, se colocaron el PPG2000 y el DMPA. La mezcla se calentó a 98 °C manteniendo agitación continua y burbujeo de aire seco durante media hora. Transcurrido ese tiempo, se bajó la temperatura a 90 °C y se adicionó el H<sub>12</sub>MDI con el DBTDL. La mezcla de reacción se mantuvo en esas condiciones durante 140 minutos.



**Figura 3.1.** Reactor utilizado para la síntesis del poliuretano.

#### 3.4.2. Síntesis del prepolímero con grupos vinílicos terminales

El prepolímero poliuretánico así obtenido conteniendo 6,5 % de grupos NCO sin reaccionar, se llevó a 45 °C y se le adicionó la cantidad necesaria de HEMA (disuelto en acetona) gota a gota y con agitación. El sistema se dejó reaccionar durante 90 minutos y posteriormente se elevó la temperatura a 60 °C manteniendo las condiciones hasta obtener el valor esperado de grupos isocianato sin reaccionar (aprox. 50 minutos).

#### 3.4.3. Neutralización

La mezcla se ajustó a 45 °C para así adicionar lentamente la TEA (en acetona), y se dejó reaccionar durante 60 minutos con el objeto de neutralizar los grupos carboxílicos.

#### 3.4.4. Dispersión en agua

El prepolímero neutralizado se dispersó sobre agua conteniendo la cantidad adecuada de extensor de cadena, obteniéndose así una dispersión acuosa de poliuretano con dobles enlaces terminales. La dispersión se realizó a 300 rpm y 30 °C durante 45 min.

#### 3.4.5. Síntesis de dispersión poliuretánica polimerizada

La dispersión poliuretánica conteniendo dobles enlaces terminales se sometió finalmente a una polimerización radicalaria en dispersión mediante el agregado de persulfato de amonio (APS), obteniéndose como producto final una dispersión de poliuretano polimerizada (PU).

Para ello, se colocó la dispersión de poliuretano en un nuevo reactor provisto de agitador mecánico, refrigerante con trampa para gases y sistema para burbujeo de N<sub>2</sub>. El sistema se saturó con N<sub>2</sub> durante 40 minutos para eliminar el O<sub>2</sub> disuelto mientras se llevó la temperatura de la mezcla a 80 °C. Posteriormente se adicionó una solución acuosa de APS (0,015 % p/p de iniciador respecto del contenido de HEMA), a la cual previamente se le hizo pasar N<sub>2</sub>. El sistema se dejó reaccionar durante dos horas. Concluido el tiempo de reacción la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se filtró para eliminar posibles agregados y se reservó en frasco de vidrio color caramelo. El esquema completo de reacción se muestra en la Figura 3.2.

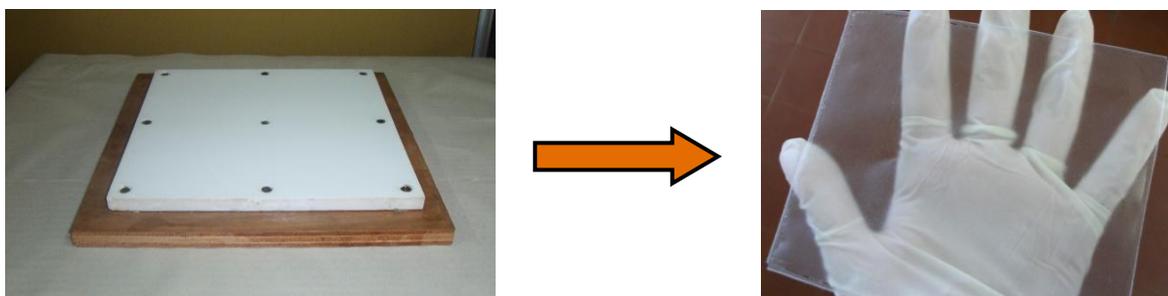


### 3.5.2. Solubilización del polivinílico (PVA)

Se utilizó PVA de un grado de hidrólisis del 98 %, y un peso molecular entre 13.000 y 23.000. Para obtener una solución homogénea de PVA en agua destilada se realizó una mezcla en relación 1:6 que se mantuvo durante 24 horas a 90 °C en baño de aceite de silicona con agitación magnética y refrigerante.

### 3.5.3. Obtención de las películas

Para obtener las dispersiones formadoras de película se colocó en vaso de precipitados primero el agua destilada, luego la dispersión de PU, luego la dispersión de PVA y por último el almidón gelatinizado y enfriado a temperatura ambiente. El proceso se llevó a cabo con agitación mecánica, y luego de agregar todos los volúmenes se dejó en agitación 30 minutos antes de moldear. Luego las dispersiones fueron depositadas sobre placas de Teflon<sup>®</sup> niveladas, y se obtuvieron las películas por evaporación de agua a 25 °C y 65 % de humedad relativa (HR) luego de 72 horas (Figura 3.3). Todas las películas resultantes se prepararon a partir de mezclas que contenían 3 % de sólidos.



**Figura 3.3.** Obtención de las películas poliméricas por casting.

Las películas obtenidas se retiraron de las placas empleando guantes de látex y se almacenaron en folios plásticos cerrados para preservarlas de la humedad y la luz. Debido al proceso de retrogradación que sufre el almidón, para los estudios de caracterización se utilizaron películas con el menor tiempo posible transcurrido luego de su preparación (típicamente hasta 2-3 días luego de almacenadas).

#### 3.5.4. Evaluación de un tratamiento térmico de las películas (“curado”)

Con el fin de lograr una mayor coalescencia en las películas, se evaluó la posibilidad de realizar un tratamiento térmico (curado) a 60 °C durante 24 h de las películas buscando de esa manera mejorar las propiedades mecánicas de las mismas.

#### 3.5.5. Adición de los compuestos activos

##### 3.5.5.1. Incorporación de antioxidantes

Se prepararon películas con butilhidroxitolueno (BHT) y con  $\alpha$ -tocoferol. El objetivo de esta incorporación fue otorgarle a las películas propiedades antioxidantes.

La incorporación de un aditivo a una matriz polimérica puede realizarse siguiendo diferentes estrategias, dependiendo de las características del mismo. Una alternativa es incorporar el aditivo en la dispersión precursora de las películas, y la otra es sumergir una película ya formada en una solución del aditivo. En el presente caso, dada la naturaleza hidrofóbica de los antioxidantes típicos empleados en alimentos, sólo es factible la primera de ellas. Por lo tanto, los diferentes aditivos fueron agregados a la dispersión precursora. Para facilitar la homogeneización de la dispersión el aditivo fue previamente disuelto en un solvente adecuado. La elección del solvente se hizo teniendo en cuenta en primer lugar que fuera un buen solvente del aditivo de tal manera de utilizar una mínima cantidad del mismo, en segundo lugar que su incorporación produjera una mínima perturbación de la dispersión acuosa, y por último que se evaporara fácilmente al formar la película. Para ambos antioxidantes se utilizó etanol absoluto, que cumplía con las características antes descritas.

Los antioxidantes fueron agregados en concentraciones diferentes cada uno; en el caso del BHT se incorporó al 3 y 5 % p/p, y en el caso del  $\alpha$ -tocoferol se incorporó al 1, 3 y 5 % p/p. El porcentaje está referido al contenido de sólidos de la dispersión. La masa adecuada de aditivo necesaria para preparar las películas se disolvió en el solvente y se procedió al agregado gota a gota bajo agitación magnética de la dispersión, y permaneciendo con agitación durante 5 minutos luego del agregado de la última gota de solución del aditivo. En el caso del BHT la incorporación se realizó a 80°C.

### 3.5.5.2. Incorporación de antifúngicos

Como antifúngicos se utilizó sorbato de potasio y pimaricina (natamicina). Este último fue utilizado en sus formas comerciales Delvo<sup>®</sup>Cid Salt, conteniendo 50 % de NaClyDelvo<sup>®</sup>CidXT1, conteniendo 50 % de goma xántica La natamicina fue donada gentilmente por Miguel Lombardo de Harmony Group, división Food Specialties.

El sorbato de potasio se ensayó en solución acuosa 1, 2 y 3 % p/p.

Para el agregado de natamicina a las dispersiones, se procedió a solubilizar la cantidad de natamicina, adecuada para obtener películas al 0,1 o 1 % según correspondiera, en agua destilada, como parte de la cantidad de agua que correspondía a cada formulación. La solubilización se llevó a cabo con agitación magnética durante 2 horas a 40 °C, condiciones que fueron las más adecuadas para lograr la disolución.

Luego del proceso de solubilización, la mezcla natamicina-agua fue agregada a la dispersión almidón/PVA o almidón/PVA/PU gota a gota con agitación magnética, y luego de finalizado el agregado se dejó agitando durante 5 minutos para homogeneizar la mezcla.

La incorporación de 1 % de natamicina, aunque supera lo permitido por el CAA, se realizó buscando obtener películas que evidencien cambios significativos durante la caracterización y establecer de esa manera la presencia de interacciones específicas.

## **3.6. Caracterización de las dispersiones y las películas**

### 3.6.1. Contenido de sólidos de la dispersión acuosa poliuretánica

Los sólidos constituyen la porción no volátil presente en la dispersión. Después de la deposición de la misma sobre un determinado sustrato, la porción sólida de ésta formará la película. El contenido de sólidos se determinó gravimétricamente mediante el agregado de aproximadamente 1 g de la dispersión ( $m_2$ ) a una cápsula de papel aluminio ( $m_1$ ), la cual posteriormente se colocó en estufa a 60 °C hasta obtener peso constante ( $m_3$ ). El contenido de sólidos se calculó según la siguiente expresión (Ecuación 1):

$$\% \text{ Sólidos} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

### 3.6.2. Contenido de humedad de las películas

El contenido de humedad se determinó luego de secar la película en una estufa a 105 °C durante 24 h o hasta peso constante. Las películas fueron cortadas en pequeños trozos y se colocaron en recipientes pequeños de papel de aluminio, se pesaron antes y después del secado en la estufa. El contenido de humedad se calculó como el porcentaje de pérdida de peso, respecto del peso original (ASTM, 1994). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje (%), utilizando la Ecuación 2:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $m_3$  es el peso final alcanzado por la película y la cápsula contenedora,  $m_1$  es el peso de la cápsula contenedora y  $m_2$  es el peso inicial de la película.

### 3.6.3. Grado de hinchamiento de las películas

Para determinar el grado de hinchamiento de las películas se colocaron muestras en un ambiente de 80 % de HR obtenido con una solución acuosa saturada de NaCl y KCl en proporciones iguales, y se pesaron las muestras cada hora durante las primeras 8 horas y luego a las 24 y 48 horas. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje (%) utilizando la ecuación:

$$\text{Grado de hinchamiento } \% = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

donde  $m_3$  es el peso final alcanzado por la película y la cápsula contenedora,  $m_1$  es el peso de la cápsula contenedora y  $m_2$  es el peso inicial de la película.

### 3.6.4. Espesor de las películas

El espesor se determinó utilizando un medidor digital de espesores Check Line DCN-900 (Nueva York, USA) para sustancias no conductoras sobre

sustratos no ferrosos. Se tomaron aleatoriamente diez medidas para cada película.

### 3.6.5. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Modo transmisión y ATR

La técnica de espectroscopia infrarroja se fundamenta en la absorción de la radiación IR por cambios energéticos en los estados vibracionales de las moléculas. Una molécula absorberá energía de un haz de luz infrarrojo cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se produzca una transición vibracional de la molécula. Pueden distinguirse dos categorías básicas de modos vibracionales: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión involucran cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos o más enlaces. Cada molécula presenta un espectro IR característico y en alguna región del espectro presentan señales muy particulares (huella dactilar), debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo. De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en esta zona del espectro, podemos obtener información acerca de las moléculas o grupos funcionales que componen dicha sustancia.

Para obtener el espectro IR, un rayo de luz infrarrojo atraviesa la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida en cada número de ondas (que corresponde a la inversa de la longitud de onda y se expresa en  $\text{cm}^{-1}$ ). Esto puede lograrse barriendo con un rayo monocromático, obtenido a partir de una red de difracción, o usando transformada de Fourier para analizar todas las longitudes de onda a la vez. A partir de esto, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia que indica a cuáles longitudes de onda la muestra absorbe, lo que permite una interpretación de qué enlaces o grupos funcionales están presentes. Si la muestra en estudio contiene pocos modos activos en IR, se obtienen espectros simples; estructuras moleculares más complejas llevan a espectros con mayor número de bandas de absorción y por ende más complejos, sin embargo esta técnica se puede utilizar para la caracterización de sustancias

estructuralmente complejas y en particular en el estudio de la compatibilidad de mezclas poliméricas.

En la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo medio (con números de ondas entre  $4000$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$ ) se suelen observar una serie de bandas de absorción asignadas principalmente a modos vibracionales de enlaces de dos átomos o ángulos de enlace de tres átomos. Estos modos vibracionales derivan en general de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces. En la zona del infrarrojo lejano (entre  $1300$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ ), la asignación de las bandas de absorción a modos vibracionales es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas corresponde a movimientos que involucran varios átomos. Esta última zona es la denominada huella dactilar; en esta región espectral, diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones en los máximos de absorción.

La reflectancia total atenuada (ATR) es una técnica espectroscópica de análisis de amplia utilidad para una gran variedad de muestras y en general de fácil empleo debido a que muy poca o ninguna preparación de la muestra es requerida para su realización (Harrick, 1967). Como su nombre lo indica, el principio de esta medida se basa en el fenómeno de la reflexión total interna y la propagación de la luz a través de un cristal con un elevado índice de refracción. Cuando el haz IR de un espectrofotómetro es dirigido hacia un cristal ópticamente denso (de alto índice de refracción) con un cierto ángulo de incidencia (el cual debe ser mayor que el ángulo crítico), éste es reflejado a través del mismo. Si una muestra es colocada en contacto con el cristal, la radiación infrarroja interactuará con la muestra produciendo de esta manera un espectro. Esta interacción se produce a través de una serie de ondas, llamadas ondas evanescentes, las cuales se generan cada vez que el haz es reflejado por la superficie interna del cristal. La onda evanescente penetra una corta distancia en la muestra ( $1$  a  $4\text{ }\mu\text{m}$ ) en cada punto de reflexión, interactuando con ésta. De esta manera, la luz que viaja a través del cristal se verá atenuada por la absorción de la muestra (de ahí el nombre de la técnica) obteniendo así información espectral de la misma. La radiación (atenuada) deja el cristal en el lado opuesto y es dirigida hacia el detector, que registra la radiación infrarroja generando de esa manera un espectro infrarrojo de la muestra similar al obtenido por transmisión. Debido a que la penetración de la onda evanescente depende de la longitud de onda de la

radiación incidente, para una comparación con espectros de transmisión se debe aplicar una corrección (Harrick, 1967).

Los espectros FT-IR en este trabajo fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro FT-IR Nicolet 380 (EEUU). Esta técnica fue utilizada para caracterizar los aditivos, las películas y para observar diferencias entre éstas y las películas aditivadas. Para obtener el espectro de los aditivos se confeccionaron pastillas con KBr conteniendo aproximadamente 5 % p/p del compuesto a analizar.

Para llevar a cabo la caracterización superficial mediante el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), se utilizó un cristal de ZnSe de monoreflexión con las siguientes características: índice de refracción: 2,4 a  $1000\text{ cm}^{-1}$ , ángulo de incidencia:  $45^\circ$  y profundidad de penetración:  $2\ \mu\text{m}$ . En todos los casos se realizaron 64 barridos.

#### 3.6.6. Espectroscopia UV-Visible

Los espectros fueron obtenidos utilizando un espectrómetro Nicolet Genesis 10 en su modalidad de transmisión, en el rango de longitudes de onda de 200 a 800 nm. Se obtuvieron los espectros de películas con y sin aditivos. Para las películas aditivadas, el objetivo fue encontrar bandas características que verificaran la presencia de los aditivos en las películas o cambios de las bandas características de la matriz polimérica por interacciones con el aditivo.

#### 3.6.7. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La homogeneidad y apariencia de las películas se evaluó a partir del análisis visual de las mismas con el ojo desnudo y por SEM con un microscopio electrónico FEI-Quanta 200 (Holanda), en el modo alto vacío (Hi-Vac). Las películas fueron previamente metalizadas, para evitar problemas de carga en las mismas. Se realizaron observaciones superficiales y de cortes transversales. En este último caso se realizó la fractura de la película sumergiéndola previamente en nitrógeno líquido, para evitar el uso de tijeras u otro sistema de corte que pudiera generar daños o rebordes en la película. Las películas se recubrieron con una capa de oro (40-50 nm), permitiendo así la visualización de las superficies y de las secciones transversales. El voltaje del filamento de W fue de 15 o 20 KeV según el caso y la corriente de emisión de alrededor de  $100\ \mu\text{A}$ .

### 3.6.8. Propiedades térmicas

#### 3.6.8.1. Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)

La calorimetría diferencial de barrido es la técnica más comúnmente utilizada en la determinación de las transiciones de fase en materiales orgánicos, inorgánicos o de uso alimenticio. Los calorímetros miden el flujo calórico diferencial requerido para mantener una muestra y una referencia inerte a la misma temperatura, sometidas a un programa de calentamiento o enfriamiento controlado. Los cambios entálpicos se registran como endotermas o exotermas, según el proceso que se produzca en la muestra.

La calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm) permite separar el flujo de calor en sus contribuciones reversible y no-reversible, lo cual permite un análisis discriminado de transiciones propias de la muestra (reversibles) o transiciones debidas a su historia térmica (irreversibles).

Las curvas DSCm fueron obtenidas con un equipo DSC Q 100, TA Instruments, (EEUU), entre -100 y 200 °C dependiendo de la muestra, a una velocidad de calentamiento/enfriamiento de 2,5 °C.min<sup>-1</sup>, modulada con una senoide de 1 °C de amplitud y un período de 60 segundos. Las muestras (entre 6 y 10 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio con tapa, empleando, como referencia, una cápsula vacía. La temperatura a la que ocurre cada transición fue determinada a través del punto de inflexión en la señal de calor reversible empleando el software Universal Analysis 2000.

#### 3.6.8.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de los materiales se llevó a cabo con un equipo Shimadzu TGA-50 utilizando 4 mg de muestra en cápsulas de aluminio. Los estudios se realizaron en modo dinámico a una velocidad de calentamiento de 30 °C.min<sup>-1</sup> desde 20 °C hasta 550 °C, bajo una atmósfera inerte de N<sub>2</sub> con un caudal de 30 ml.min<sup>-1</sup>.

A partir de las curvas obtenidas, se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Temperatura inicial de descomposición (TID): expresa la estabilidad térmica.
- Índices térmicos T<sub>5</sub> y T<sub>50</sub>: corresponden a las temperaturas a las cuales se elimina el 5 y el 50 % de la masa inicial, respectivamente (Barrera y col., 2007).
- Contenido de agua residual: se determina a partir de la curva de pérdida de peso, tomando el primer tramo de pérdida.

- Masa residual a 540 °C.

### 3.6.9. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

El coeficiente de permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinado gravimétricamente a 10 °C según el método de ensayo ASTM E96-95 (Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials), utilizando una celda como la que se muestra en la Figura 3.4. El área de la superficie libre para el pasaje del vapor fue de 18,85 cm<sup>2</sup>. En el interior de las celdas se utilizó como desecante silica gel granulada logrando un 10 % de humedad relativa. Las celdas fueron colocadas dentro de un desecador mantenido una humedad relativa constante del 100 %, obtenida con agua destilada. Las celdas, una vez alcanzado el equilibrio, fueron pesadas regularmente hasta peso constante, con balanza analítica.



**Figura 3.4.** Celda utilizada en los ensayos de permeabilidad al vapor de agua.

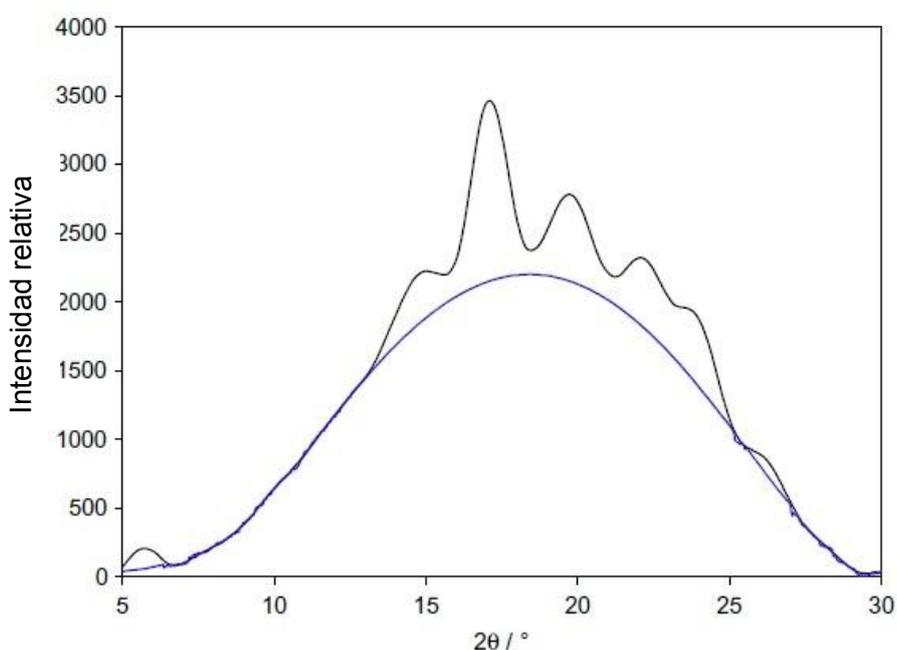
El coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (WVP) fue calculado utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 4):

$$WVP = \frac{(G/t) \times L}{A \times P_w \times (RH_1 - RH_2)} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde **WVP** es el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua [ $\text{g}\cdot\text{cm}/(\text{m}^2\cdot\text{día}\cdot\text{mmHg})$ ]; **G/t** es la ganancia de peso en el estado estacionario [ $\text{g}/\text{s}$ ]; **L** es el espesor promedio de la película [ $\text{cm}$ ]; **A** es el área de permeación [ $\text{m}^2$ ]; **(RH<sub>1</sub> - RH<sub>2</sub>)** es la diferencia de humedad relativa (0,90) entre las dos cámaras de la celda y **P<sub>w</sub>** es la presión parcial de vapor de agua a la temperatura de ensayo [ $\text{mm Hg}$ ]. El resultado fue convertido a las unidades  $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$  para fines comparativos. El valor de P<sub>w</sub> para 10 °C fue P<sub>w</sub>=9,2118 mm Hg.

### 3.6.10. Análisis de difracción de rayos-X (DRX)

Un espectro de difracción de rayos X de un material semicristalino como el almidón, se caracteriza por la presencia de picos definidos de difracción y una contribución correspondiente a la región amorfa; cuanto mayor es esta contribución, menor es el grado de cristalinidad de la muestra (Figura 3.5). Esta técnica permite obtener información sobre la estructura del material analizado ya que el diagrama de difracción es característico de las sustancias cristalinas.



**Figura 3.5.** Diffractograma típico de un material semicristalino.

El análisis de difracción de rayos-X se llevó a cabo en un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, USA) equipado con una fuente de radiación Cu K $\alpha$  de 1,5403 Å. La tensión y la corriente utilizada fueron de 40 kV y 40 mA,

respectivamente. Los difractogramas fueron obtenidos en el rango de 3-40°/2 $\theta$  con una velocidad de barrido de 0,0044°/s.

### 3.6.11. Propiedades mecánicas de tracción

#### 3.6.11.1. Ensayos mediante texturómetro

Se realizaron ensayos de tracción en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Reino Unido) empleando mordazas de tensión ATG. Se utilizaron películas de 10cm  $\times$  0.6 cm y se ensayaron al menos diez probetas por cada tipo de película. Mediante el software Texture Expert Exceed se registraron automáticamente las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) y a partir de las mismas se calcularon los siguientes parámetros de acuerdo al método ASTM D882-91 (ASTM, 1996): tensión máxima de ruptura (N/mm<sup>2</sup>) y porcentaje de elongación a la ruptura (deformación a la ruptura dividido la longitud inicial de la probeta, %). El esfuerzo de tensión (MPa) se calculó dividiendo la fuerza a la ruptura por la sección transversal del film (espesor por el ancho de la probeta).

#### 3.6.11.2. Ensayos mediante Análisis Mecánico Dinámico

Para este ensayo se utilizaron muestras de películas de 6 mm  $\times$  30 mm. Se analizaron los perfiles de las curvas de tensión-deformación obtenidos con un equipo de análisis mecánico dinámico DMA TA Instruments-Q800 (New Castle, DE, USA), equipado con pinzas de tensión. Uno de los extremos estaba unido a una pinza móvil mientras que el otro extremo se mantuvo fijo. Se trabajó a 25 °C, con una precarga de 2 N y una rampa constante de fuerza de 0,9 N.min<sup>-1</sup> que fue aplicada hasta la ruptura del film. Al menos se registraron cinco replicados de cada muestra estudiada.

### **3.7. Análisis estadístico**

En los casos correspondientes, los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANAVA) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , utilizando el programa InfoSTAT.

### **3.8. Resultados y Discusión**

#### **3.8.1. Películas base**

##### **3.8.1.1. *Obtención de las películas***

En una primera instancia se obtuvieron películas por deposición (“casting”) de componentes puros y también de distintas combinaciones de componentes para modificar las propiedades del almidón gelatinizado, buscando mejorar la capacidad de formación de película. Para esto se utilizó glicerol, PVA, y diferentes poliuretanos (PU) sintetizados previamente en nuestro laboratorio en forma de dispersiones acuosas. Uno de los PU ensayados estaba funcionalizado con un monómero que le confería a la cadena un enlace vinílico. Este PU se utilizó tal cual se obtenía después de hacer la extensión de cadena que sigue a la dispersión en agua conteniendo el extensor. En este estadio, el PU presenta dobles enlaces libres, además de ser muy sensible al agua y tener excesiva adhesividad al tacto. El PU polimerizado se diferencia del anterior en que una vez hecha la dispersión con la extensión, se desgasa y se le agrega persulfato de amonio (APS) para polimerizarlo. El PU:DEA 90/10 se preparó con PU sin polimerizar, y se le agregó un monómero con grupos amino y se polimerizó, obteniéndose así un híbrido PU/acrílico.

Se estudió la obtención de películas con dispersiones acuosas conteniendo 3 y 6 % de sólidos. Con los componentes seleccionados se procedió a obtener las películas para su posterior estudio.

La dispersión con 6 % de sólidos resultó muy viscosa, con presencia de grumos y difícil de manipular, por lo que se decidió trabajar con dispersiones al 3 % de sólidos en todas las formulaciones.

Cada película fue evaluada según si evidenció separación de fases, la flexibilidad y la resistencia al quiebre manual, característica expresada como fragilidad. La escala utilizada fue de (-) a (++++), siendo (-) indicativo de “no flexible” o bien “no frágil” según la columna, y los signos (+) indicativos de flexibilidad o fragilidad, a mayor cantidad de signos, mayor es el efecto evaluado. Cuando hubo separación de fases no se evaluaron las características de la película. Los resultados pueden observarse en la Tabla 3.1. Sólo se aclara “sin polimerizar” en los casos correspondientes, en los demás casos el PU estaba polimerizado.

**Tabla 3.1.** Formulaciones ensayadas y su evaluación en función de su flexibilidad, fragilidad y separación de fases.

Formulaciones	Separación fases	Flexibilidad	Fragilidad
PVA	NO	++	+
Almidón gelatinizado (ALM)	NO	+	+++
Almidón sin gelatinizar	SI		
PU H <sub>12</sub> MDI PPG 1000	NO	++++	+
PU H <sub>12</sub> MDI PPG 1000 sin polimerizar	NO	+++	-
PU:2-dietilaminoetil metacrilato (DEA) (90:10)	NO	++++	-
PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000	NO	++++	-
ALM/PVA 70:30	NO	+	++
ALM/PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000 sin polimerizar 70:30	NO	+	+++
ALM/PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000 70:30	NO	++	+
ALM/PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000 polimerizado 70:30	NO	+	++
ALM/PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000:DEA(90:10) 70:30	NO	+	+++
ALM/PU catiónico 70:30	SI		
ALM/PU H <sub>12</sub> MDI PPG1000 50:50	NO	++	++
ALM/PU sin polimerizar 50:50	NO	+	++
ALM/PVA/glicerol 70:25:5	NO	+	+++
ALM/PVA/glicerol 70:20:10	NO	++	+
ALM/PVA/H <sub>12</sub> MDI PPG1000 70:20:10	NO	+	++
ALM/H <sub>12</sub> MDI PPG1000/glicerol 70:20:10	NO	++	+
ALM/H <sub>12</sub> MDI PPG1000/glicerol 70:25:5	NO	+	++
ALM/PVA/H <sub>12</sub> MDI PPG1000 70:15:15	NO	+++	+
ALM/PVA/H <sub>12</sub> MDI PPG2000 70:25:5	NO	+++	-
ALM/PVA/H <sub>12</sub> MDI PPG2000 70:20:10	NO	+++	-
ALM/PVA/H <sub>12</sub> MDI PPG2000 70:15:15	NO	+++	-

Las películas que presentaron separación de fases fueron el almidón sin gelatinizar (como era de esperar) y la mezcla de almidón gelatinizado con 30 % de poliuretano catiónico. En el segundo caso se observó que este PU por su naturaleza catiónica no resultó compatible con el almidón. Las películas de PU puros de distinto tipo mostraron alta flexibilidad y resistencia al quiebre.

Las mezclas de almidón al 70 % con PVA mostraron la misma performance que las de almidón al 70 % con PU polimerizado y que las películas tricomponente de almidón al 70 % con PU H<sub>12</sub>MDI (PPG1000) y 5 % de glicerol: todas resultaron poco flexibles y con una cierta resistencia al quiebre, pero no muy alta. Las mezclas que incorporaron glicerol no resultaron eficientes ya que el glicerol se utilizó en baja proporción, siempre buscando maximizar el contenido de almidón, con lo cual las propiedades resultantes del material no fueron las buscadas. Se observó que cuando se incorporaba poliuretano a las combinaciones era más efectivo que el glicerol en igual proporción, pero que el efecto era notorio con cantidades altas (15%), y por eso finalmente se desarrolló especialmente en el laboratorio un PU a base de H<sub>12</sub>MDI y PPG 2000 que se ajustara a lo que se necesitaba para lograr las características deseadas, como se puede observar en las últimas filas de la tabla.

En función de esta evaluación preliminar se eligió continuar trabajando con las mezclas conteniendo almidón, PVA y PU H<sub>12</sub>MDI con PPG 2000, que, a diferencia del PPG 1000 presentaba mayor flexibilidad y menor fragilidad al quiebre. Las proporciones elegidas para continuar los ensayos se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2.** Proporciones de los componentes evaluados.

<b>Componentes/Formulaciones</b>	<b>Porcentajes</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Almidón gelatinizado	70	70	70	70
Alcohol polivinílico (PVA)	30	25	20	15
Poliuretano H <sub>12</sub> MDI/PPG2000 (PU)	---	5	10	15

El contenido de sólidos de la dispersión acuosa de poliuretano experimental fue de 26%.

### 3.8.1.2. Evaluación de un tratamiento térmico de las películas (“curado”)

El curado térmico de las películas a 60 °C no resultó efectivo ya que las películas se fragilizaron por pérdida del agua que actuaba como plastificante por lo que fue contraproducente, y por tal motivo se decidió continuar los ensayos sin el curado.

### 3.8.1.3. Caracterización de las películas

#### 3.8.1.3.1. Contenido de humedad y espesor de las películas

El almidón se caracteriza por su habilidad de retener agua. Este agua residual contribuye a la estructura y, como se ha estudiado, influye ampliamente en sus propiedades (Zhong y Sun, 2005).

En la Tabla 3.3 se muestra el contenido de agua residual en las películas.

**Tabla 3.3.** Contenido porcentual de agua de las películas.

<b>Formulación</b>	<b>Contenido de agua (%)</b>
Almidón puro	8,9 <sup>a</sup>
Alm/PVA 70:30	10,4 <sup>b</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5	9,6 <sup>c</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10	8,0 <sup>d</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15	8,1 <sup>d</sup>

Letras iguales indican medias iguales,  $\alpha=0,05$ .

Las películas de almidón puro presentaron un contenido de agua residual de 8,9 % p/p. Esta cantidad de agua es suficiente para una organización del almidón en regiones amorfas y cristalinas (Capron y col., 2007). El agregado de PVA como plastificante aumenta significativamente el contenido de humedad de las películas, debido a la alta hidrofiliidad del mismo. Cuando se incorpora PU a las formulaciones, se observa una disminución del contenido de humedad, siendo de aproximadamente 8 % para las películas con 10 y 15 % de PU, valor mínimo encontrado e igual para estas dos formulaciones.

Flores y col. (2007) demostraron en películas de almidón de tapioca que el método de procesamiento y secado de las películas afecta las propiedades del material, entre ellas la humedad residual. Un secado más lento permite

acomodarse de forma más empaquetada a las cadenas poliméricas, con lo cual el contenido de humedad se ve disminuido.

Con respecto al espesor, todas las películas obtenidas presentaron un espesor entre 50 y 60  $\mu\text{m}$ , ya que todas se obtuvieron a partir de dispersiones con el mismo contenido de sólidos de 3 % p/p en su formulación y retuvieron porcentajes de humedad similares.

#### 3.8.1.3.2. Grado de hinchamiento en el equilibrio

Algunas de las características más importantes de los polímeros como pueden ser la permeabilidad, las propiedades mecánicas y de superficie entre otras, se ven influenciadas por el grado de hinchamiento.

En el caso de las películas estudiadas, se presentan en la Tabla 3.4 los valores obtenidos del grado de hinchamiento porcentual a las 24 hs de ensayo, tiempo al que se obtuvo el valor final de equilibrio.

**Tabla 3.4.** Valores de grado de hinchamiento obtenidos para las distintas formulaciones de películas (t=24 hs).

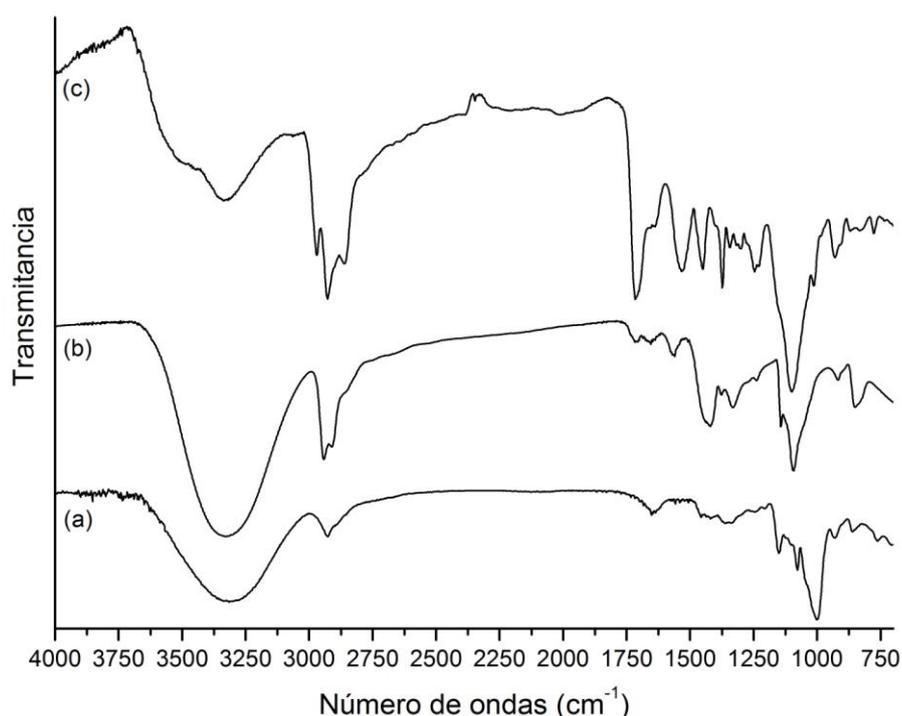
<b>Formulación</b>	<b>Grado de hinchamiento (%)</b>
Alm/PVA 70:30	9,44 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5	9,61 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10	7,46 <sup>b</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15	6,12 <sup>c</sup>

Se puede observar que las formulaciones que presentan un grado de hinchamiento mayor son la Alm/PVA 70:30 y la Alm/PVA/PU 70:25:5, quedando en evidencia que el reemplazo de PVA por PU en cantidades a partir de 10 % disminuye el grado de hinchamiento. La película 70:15:15 posee los valores menores de grado de hinchamiento; la presencia de PU dificulta el ingreso de las moléculas de agua al interior de la estructura de la película polimérica, probablemente relacionado con el carácter hidrofóbico del PU, y podría estar indicando una buena cohesión entre los componentes (Ghanbarzadeh y col., 2010).

### 3.8.1.3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Modo transmisión y ATR

Las modificaciones en las bandas de absorción (intensidad y número de ondas) de los espectros IR pueden dar información sobre la presencia de interacciones específicas entre los grupos funcionales de los polímeros u otras moléculas presentes en la matriz polimérica.

Para llevar a cabo este análisis, en primera instancia se presentan en la Figura 3.6 los espectros en modo ATR entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  de los tres materiales de base.



**Figura 3.6.** Espectros ATR corregidos-FTIR de películas de (a) almidón, (b) PVA y (c) PU puros.

El espectro del almidón muestra bandas típicas por debajo de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , donde dominan las vibraciones de las moléculas de glucosa (Kizil y col., 2002). Estas bandas se atribuyen a la contribución de tres modos vibracionales mayoritarios: estiramiento C-O, deformación y flexión C-O-H. La banda entre 3650 y 3000  $\text{cm}^{-1}$  que presenta un máximo a 3384  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los grupos -OH; mientras que la banda a 2930  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento

de los grupos  $\text{CH}_2$ . A  $1644\text{ cm}^{-1}$  se puede observar una banda relacionada con la vibración por flexión de los grupos  $-\text{OH}$  (Guerra-Della Valle y col., 2008; Han y col., 2012). Entre  $865$  y  $850\text{ cm}^{-1}$  se encuentra una banda asignada a la vibración de las  $\alpha$ -D-glucopiranosas (Sabatier, 2005), en este caso se observa a  $857\text{ cm}^{-1}$ . Entre  $1250$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  se pueden observar bandas relacionadas con el estiramiento C-O del almidón (Guerra-Della Valle y col., 2008; Han y col., 2012; Sabatier, 2005).

Capron y col. (2007) han utilizado FTIR para estudiar los estados gomosos y vítreos del almidón, identificando almidón en estado amorfo a través de una banda alrededor de los  $1022\text{ cm}^{-1}$  y almidón en estado cristalino con una banda a  $1047\text{ cm}^{-1}$ . En la Figura 3.7, se observan estas señales como hombros a  $1017$  y  $1047\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

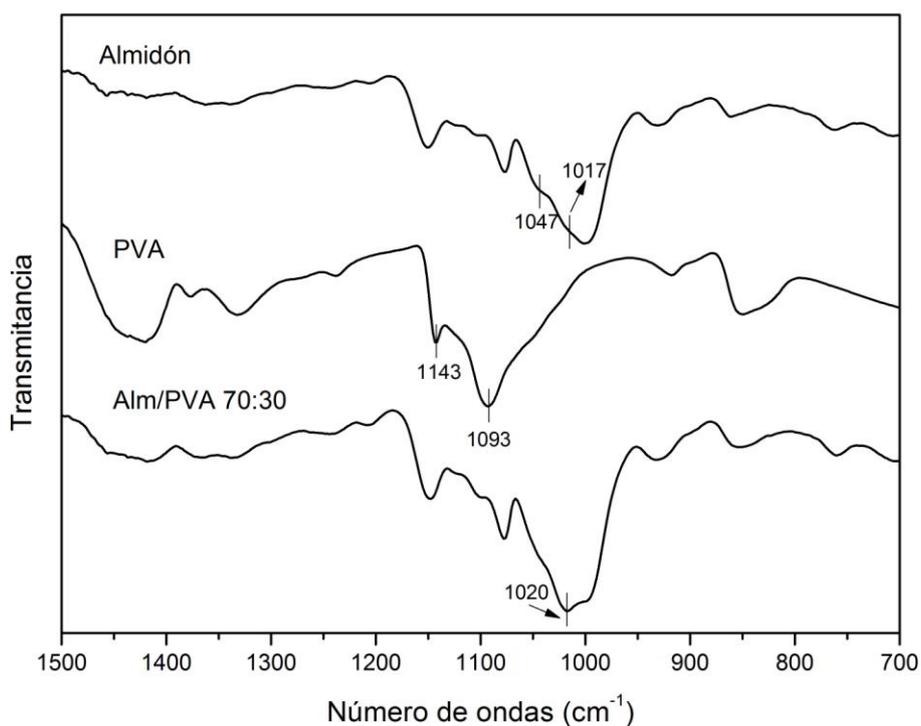
Con respecto al PVA, se pueden identificar diversas bandas, entre ellas: la banda a  $3390\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los OH de los alcoholes, bandas a  $2942$  y  $2912\text{ cm}^{-1}$  de los estiramientos C-H de los grupos  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}$  y , la banda a  $1435\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la flexión en el plano del grupo C-OH de alcoholes; también una banda a  $1337\text{ cm}^{-1}$  de vibración-flexión de los grupos OH, una banda correspondiente a la flexión en el plano de C-OH de alcoholes a  $1238\text{ cm}^{-1}$ , un pico de absorción a  $1143\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a la parte cristalina del PVA, relacionada con el estiramiento del carbonilo (C=O); una banda a  $1093\text{ cm}^{-1}$  también correspondiente al estiramiento de C-O, y una banda a  $852\text{ cm}^{-1}$  del estiramiento de los enlaces C-C (Arredondo y col., 2011; Ilcin y col., 2010; Jia y col., 2007 ; Mallapragada y Peppas, 1996; Sudhamani y col., 2003).

El PU  $\text{H}_{12}\text{MDI/PPG2000}$  presenta las bandas características de los poliuretanos, donde se destacan las bandas de estiramiento N-H, la banda de estiramiento del grupo C=O, la banda amida II (combinación de NH y CN), y la banda de C-O-C del polipropilenglicol (Pardini y Amalvy, 2008; Peruzzo y col., 2011). El detalle de la asignación de las bandas puede observarse en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Principales asignaciones de las bandas FTIR del PU H<sub>12</sub>MDI/PPG2000.

Asignación	Números de onda (cm <sup>-1</sup> )
$\nu$ O-H (DMPA)	3510
$\nu$ N-H (uretano-urea; enlazado a H)	3380
$\nu$ N-H (uretano-urea; no enlazado)	3340
$\nu$ C-H (asimétrico, simétrico)	3000-2800
$\nu$ C=O (uretano-urea; enlazado y libre)	1710
Amida II ( $\nu$ C-N + $\delta$ NH)	1517
$\delta$ C-O-C (éter)	1110

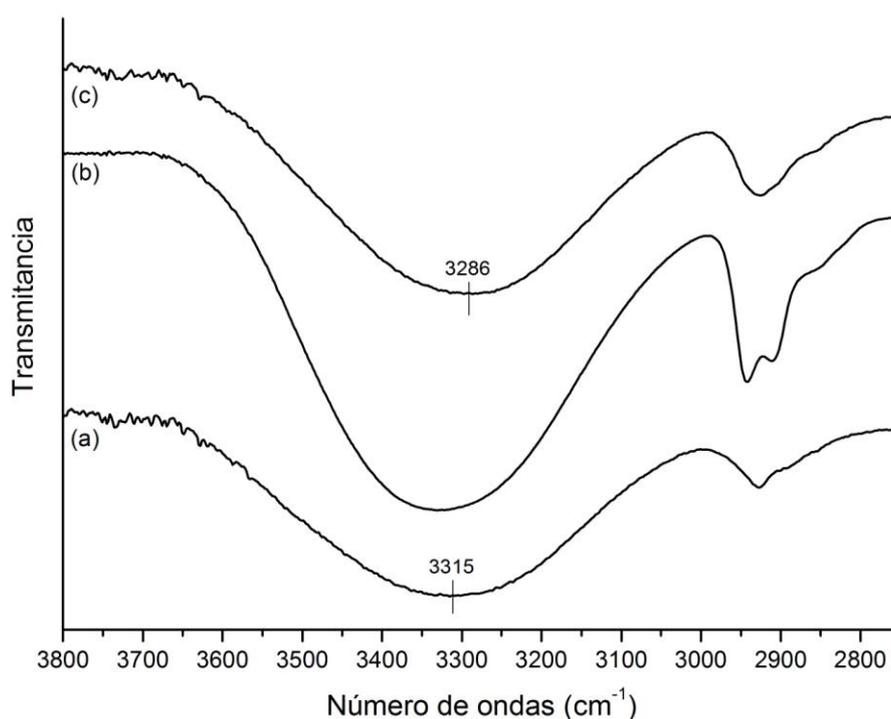
En la Figura 3.7 se muestran los espectros de películas de almidón, PVA y la mezcla almidón/PVA en relación 70:30, en la región comprendida entre 1500 y 700 cm<sup>-1</sup>.



**Figura. 3.7.** Espectro ATR corregidos de películas de almidón, PVA y la mezcla almidón/PVA en relación 70:30, detalle de la región 1500 a 700 cm<sup>-1</sup>.

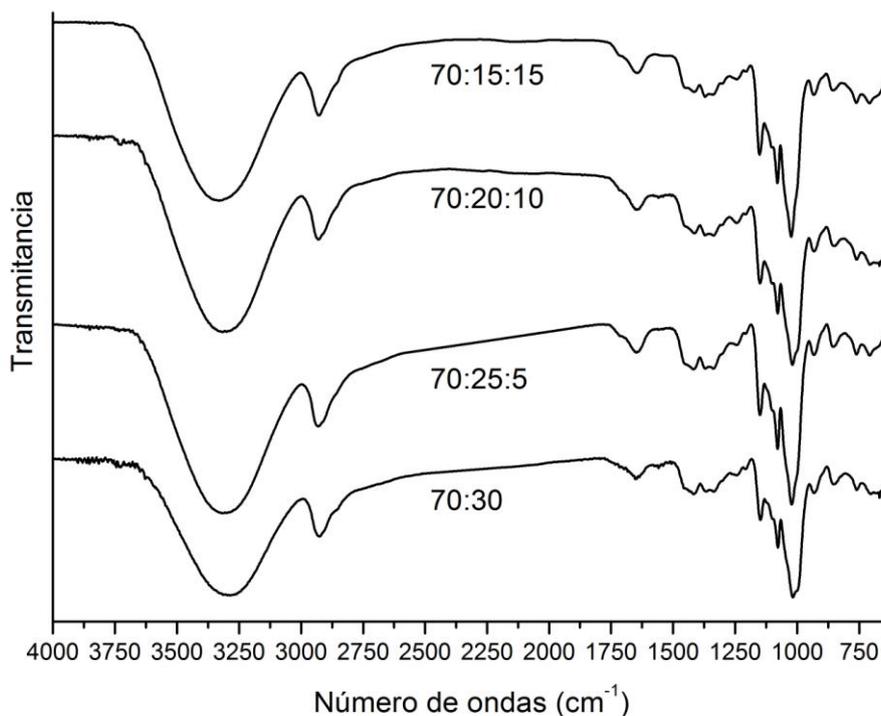
El espectro FTIR de la mezcla Alm/PVA 70:30 muestra cambios importantes en la banda a  $1000\text{ cm}^{-1}$  asignada al almidón. El almidón y el PVA son sustancias polares que contienen grupos hidroxilo en su estructura química, estos grupos altamente polares tienden a formar enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, mejorando la integridad de las mezclas, como algunos autores han reportado (Sin y col., 2010; Sin y col., 2011). También puede observarse un incremento en la intensidad de la banda del C-O amorfo a  $1020\text{ cm}^{-1}$ , que indica que el PVA maximiza la región amorfa del almidón (Luo y col., 2012).

La región correspondiente a los OH del espectro Alm/PVA también muestra la interrupción de la cristalinidad del almidón debido a la rotura de uniones puente de hidrógeno de moléculas de almidón entre sí, y de su reemplazo por uniones de hidrógeno entre el almidón y el PVA (Dean y col., 2008). Esta interacción se puede observar en la Figura 3.8 como el corrimiento de la banda del estiramiento de los OH del anillo de glucosa de  $3315\text{ cm}^{-1}$  para el almidón puro a  $3286\text{ cm}^{-1}$  cuando se incluye PVA.



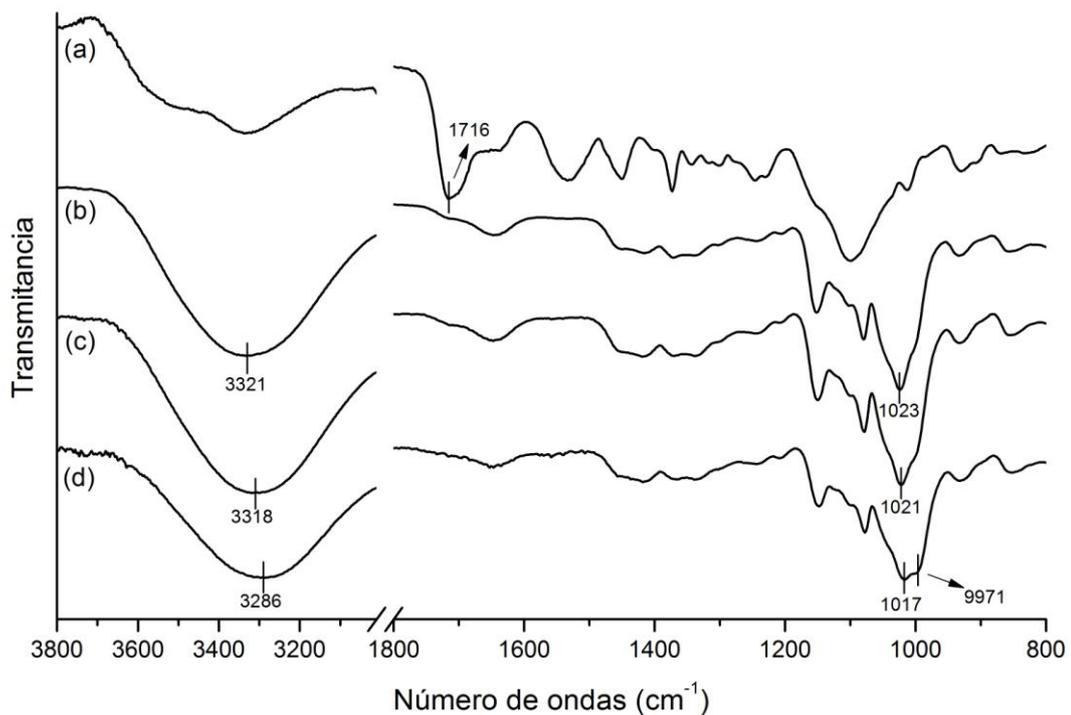
**Figura 3.8.** Espectros FTIR de películas de (a) almidón, (b) PVA y (c) mezcla almidón/PVA en relación 70:30, detalle de la región  $3800$  a  $2700\text{ cm}^{-1}$ .

La Figura 3.9 muestra los espectros FTIR completos de películas de Almidón/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15.



**Figura 3.9.** Espectros FTIR de películas de Almidón/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15.

Para poder llevar a cabo el análisis de bandas, en la Figura 3.10 se presentan los espectros de las películas Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:15:15, junto con el espectro del PU puro para fines comparativos. En esta figura se muestran las regiones de los modos vibracionales de los grupos O-H, C=O y C-O.



**Figura 3.10.** Espectros FTIR de películas de (a) PU H<sub>12</sub>MDI, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15, (c) Alm/PVA/PU 70:25:5, y (d) Almidón/PVA 70:30, en las regiones de los modos vibracionales de –OH, C=O y C-O.

La banda característica del estiramiento del carbonilo se observa claramente para la mezcla 70:15:15. Al incluir un 5% de PU, se evidencia un corrimiento de la banda OH de la mezcla Alm/PVA que estaba a 3286 cm<sup>-1</sup> hacia 3318 cm<sup>-1</sup>, y con 15% de PU esta misma banda se corre hacia 3321 cm<sup>-1</sup>, indicando que las cadenas de PU interfieren en la formación de enlaces de hidrógeno entre el almidón y el PVA, probablemente por la formación de enlaces con los grupos éter del polioliol o por interacciones puente de hidrógeno entre los grupos uretano del PU y los grupos hidroxilo del almidón.

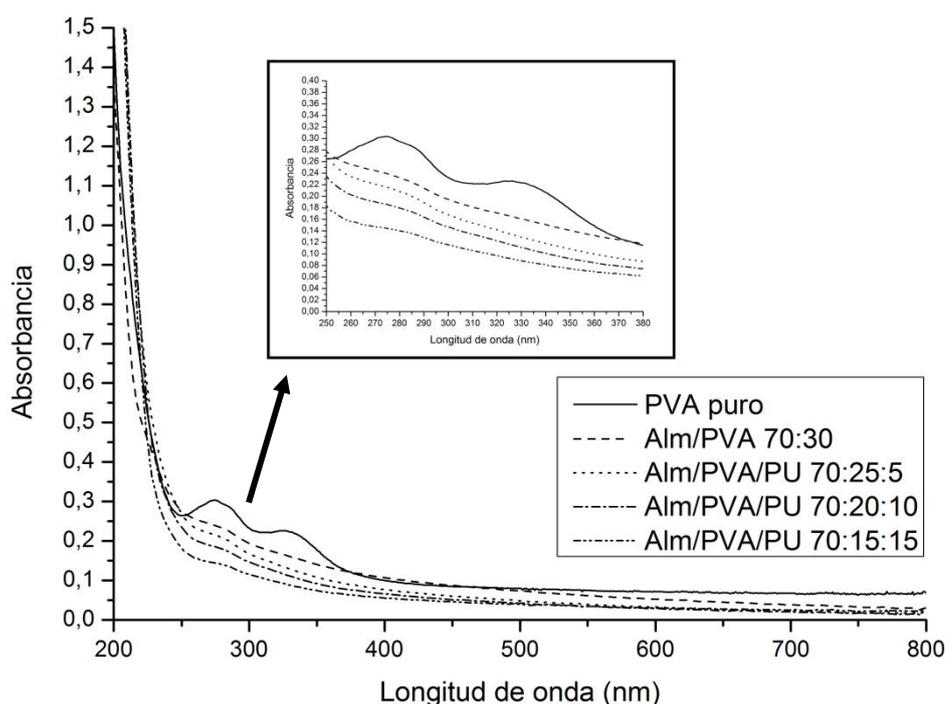
En la región C-O, hay un incremento de la intensidad de la banda a 1022 cm<sup>-1</sup>, indicativo de características más amorfas y de plastificación por parte del PU al incluirlo en la mezcla, nuevamente mostrando que las cadenas de PU modifican las propiedades de los enlaces de hidrógeno

En líneas generales, los cambios observados en la intensidad y posición de las bandas de los espectros FTIR muestran una interacción de las cadenas del PU con los grupos –OH del almidón y el PVA, lo cual contribuye a la miscibilidad

de los tres componentes de la mezcla (Benmerad y col., 2011; Icoz y Kokini, 2007).

#### 3.8.1.3.4. Espectrometría UV-Visible

En la Figura 3.11 se pueden observar los espectros electrónicos de películas de PVA puro, Alm/PVA en relación 70:30 y las tres combinaciones estudiadas de Alm/PVA/PU.



**Figura 3.11.** Espectros UV-visible de películas de PVA puro, Alm/PVA 70:30 y combinaciones de Alm/PVA/PU en proporciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15.

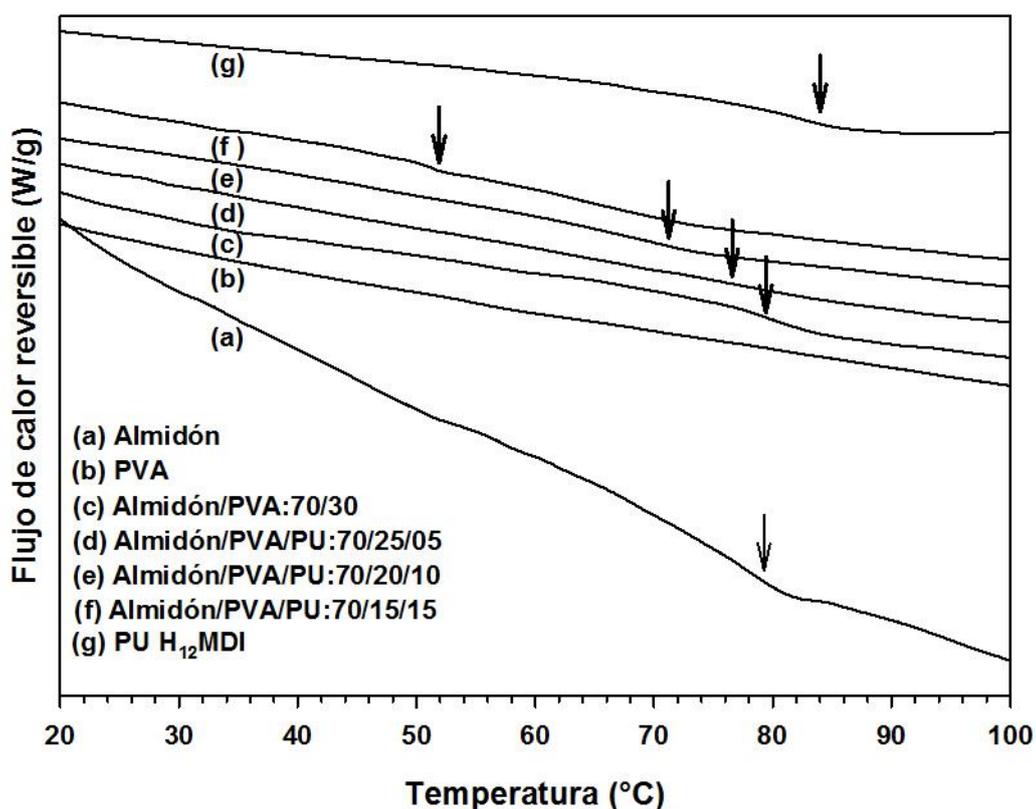
Para las películas de tres componentes se pudo observar un hombro alrededor de los 280 nm, y para la mezcla Alm/PVA 70:30 se encontró un máximo en esa longitud de onda, y otro hombro más suave alrededor de los 330 nm. Las señales detectadas en las películas compuestas de almidón y PVA, con o sin PU, corresponden a señales del PVA puro, que presenta dos bandas en esas longitudes de onda (Yu y col., 2003). Como se puede observar en la figura, cuando disminuye la cantidad de PVA presente en la película, la señal se hace más débil, hasta casi desaparecer para las películas 70:15:15.

### 3.8.1.3.5. *Propiedades térmicas*

#### 3.8.1.3.5.1. *Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)*

La técnica de calorimetría diferencial de barrido es un método muy útil para investigar la compatibilidad de una mezcla polimérica. En este caso, se estudió el comportamiento de las transiciones vítreas de los componentes y las mezclas. El uso de DSC modulado permite separar la capacidad calorífica total en sus componentes reversible y no reversible, y el cálculo de la diferencial de la capacidad calorífica respecto de la temperatura en la región de transición vítrea facilita la determinación de la temperatura de esa transición ( $T_g$ ) (Hourston y Mo Song, 2006).

Para estudiar la miscibilidad de las mezclas, se utilizó el flujo de calor reversible (FCR). Las curvas FCR de los componentes puros y las mezclas se muestran en la Figura 3.12 entre 20 y 100 °C (región relevante) y las transiciones presentes se detallan en la Tabla 3.6.



**Figura 3.12.** Flujo de calor reversible de almidón puro, PVA puro, PU H<sub>12</sub>MDI puro, Almidón/PVA 70:30 y Almidón/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15.

La curva de flujo de calor reversible para PVA puro no mostró ninguna transición en la región estudiada. Para el PU H<sub>12</sub>MDI/PPG2000 puro, la curva de FCR mostró una transición a 85 °C, que se puede asociar con los segmentos duros del polímero (Rohman y Che Man, 2013). Para el almidón puro, por su parte, se observa una transición vítrea centrada a 79 °C, que se corresponde con un almidón que contiene aproximadamente un 10 % de agua, según Zhong y Sun (2005).

La curva para Almidón/PVA mostró también una transición a 79 °C (flecha en curva "c"), que corresponde al almidón. El comportamiento térmico de diferentes mezclas de almidón de maíz y PVA sin plastificar fue descrita por Moneam y col. (2014) utilizando DSC convencional, encontrando sólo una temperatura de transición vítrea para la mezcla, cercana a la del almidón, por lo que sugirieron que existía compatibilidad entre los dos componentes.

Para la mezcla Almidón/PVA/PU 70:25:5 se encontró una señal muy débil en los 77 °C, también relacionada con la transición vítrea del almidón, y tampoco se observó señal alguna relacionada al PVA. Las cadenas de PU podrían estar provocando la rotura de los enlaces entre el almidón y el PVA, y formando nuevos enlaces, provocando una mejor compatibilización entre las fases de almidón y PVA debido a la alta movilidad de las cadenas de PU.

Al adicionar un 10 % de PU en reemplazo de PVA, se evidenció una transición vítrea centrada a 70 °C. La curva de la mezcla Almidón/PVA/PU 70:15:15 también mostró una transición, pero centrada a 52 °C. Estos resultados indican que las cadenas de PU modificaron las interacciones, plastificando las mezclas; por otra parte, el hecho de observar una sola transición es indicativo de una buena miscibilidad (Moneam y col., 2014).

**Tabla 3.6.** Transiciones térmicas de películas de los componentes puros y de las mezclas.

<b>Composición de la película</b>	<b>Transición térmica (°C)</b>
Almidón puro	79
PVA	---
Almidón/PVA 70/30	79
Almidón/PVA/PU 70/25/5	77
Almidón/PVA/PU 70/20/10	70
Almidón/PVA/PU 70/15/15	52
PU H <sub>12</sub> MDI	82

#### 3.8.1.3.5.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

La Tabla 3.7 muestra los valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos T<sub>5</sub>, T<sub>50</sub> y masa residual a 540 °C.

Para el almidón puro, el contenido de agua residual fue de 8,6 % en peso, mientras que para la mezcla Almidón/PVA se incrementó a 10,1 % debido a la hidrofiliidad del PVA. Al reemplazar parte del PVA por PU en las películas se observó una disminución de este valor cuando se incorporó por lo menos un 10 %, debido a la baja hidrofiliidad del PU, resultados coincidentes con los de Lu y col. (2005). Estos resultados referidos al porcentaje de agua residual de las películas están en concordancia con lo encontrado en la sección 3.8.1.3.1 al estudiar la humedad de las películas por secado en estufa, con la diferencia de que el valor alcanzado con 10 y 15 % de PU es estadísticamente igual a de una película de almidón puro según esta técnica.

Con respecto a la TID y la masa residual a 540 °C, no se vieron modificados por la adición de PU a las mezclas. Sólo se destaca que la TID para almidón puro es significativamente mayor que para las mezclas.

**Tabla 3.7.** Valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos T<sub>5</sub>, T<sub>50</sub> y masa residual a 540 °C de los componentes puros y mezclas.

Composición de las películas	Agua residual (%p/p)	TID (°C)*	T <sub>5</sub> (°C)	T <sub>50</sub> (°C)	Residuo <sup>#</sup> (%p/p)
Almidón puro	8,6 <sup>a</sup>	270 <sup>b</sup>	105 <sup>c</sup>	345 <sup>ab</sup>	13,0 <sup>a</sup>
Almidón/PVA 70/30	10,1 <sup>b</sup>	235,5 <sup>a</sup>	103,5 <sup>c</sup>	346,3 <sup>ab</sup>	14,5 <sup>ab</sup>
Almidón/PVA/PU 70/25/5	9,8 <sup>b</sup>	240,0 <sup>a</sup>	84 <sup>ab</sup>	348,9 <sup>b</sup>	17,2 <sup>b</sup>
Almidón/PVA/PU 70/20/10	8,7 <sup>a</sup>	236,0 <sup>a</sup>	78,5 <sup>a</sup>	340,5 <sup>a</sup>	15,3 <sup>ab</sup>
Almidón/PVA/PU 70/15/15	8,5 <sup>a</sup>	236,5 <sup>a</sup>	89,8 <sup>b</sup>	347,2 <sup>b</sup>	15,4 <sup>ab</sup>

\*TID: luego de la pérdida de agua.

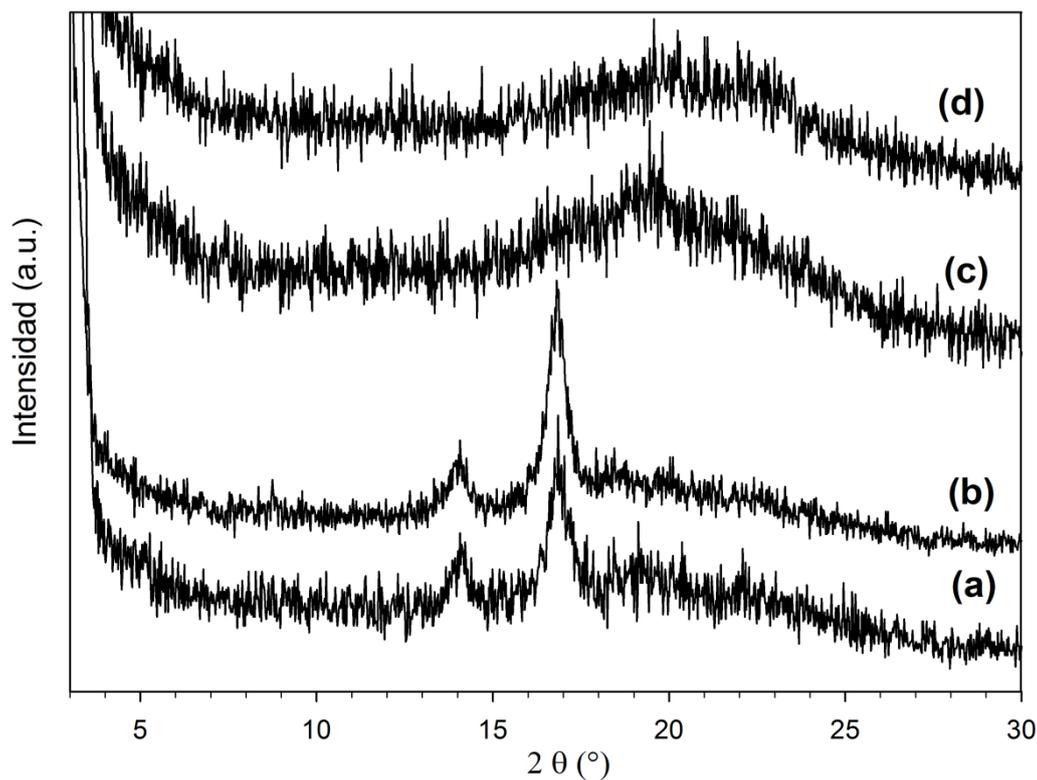
<sup>#</sup>Masa residual a 540 °C.

Letras iguales en cada columna indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Los índices térmicos T<sub>5</sub> y T<sub>50</sub> del almidón puro fueron 105 °C y 345 °C respectivamente. Al incorporar PVA, estas temperaturas no variaron. Sin embargo, cuando se reemplazó PVA por PU, el índice T<sub>5</sub> disminuyó, presentando el valor mínimo para las películas Almidón/PVA/PU 70:20:10, que se diferencia estadísticamente de las otras mezclas con PU. Los valores de T<sub>5</sub> para las películas con PU están dentro del rango de temperatura de pérdida de agua (60-100 °C), indicando que la naturaleza hidrofóbica del PU facilita la pérdida de agua en las muestras. Para el índice térmico T<sub>50</sub> se observó la misma tendencia para la mezcla Almidón/PVA/PU 70:20:10, mostrando una disminución de la estabilidad para estas películas en particular. Para las otras dos mezclas con PU al 5 y 15 % no se observó una tendencia, los valores de T<sub>50</sub> son estadísticamente iguales.

#### 3.8.1.3.6. Análisis de difracción de rayos-X (DRX)

En la Figura 3.13 se presentan los diagramas de difracción de rayos-X para películas Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15.



**Figura 3.13.** Diagramas de difracción de rayos-X entre 3 y 30° para las películas (a) Almidón/PVA 70:30, (b) Almidón/PVA/PU 70:25:5, (c) Almidón/PVA/PU 70:20:10 y (d) Almidón/PVA/PU 70:15:15.

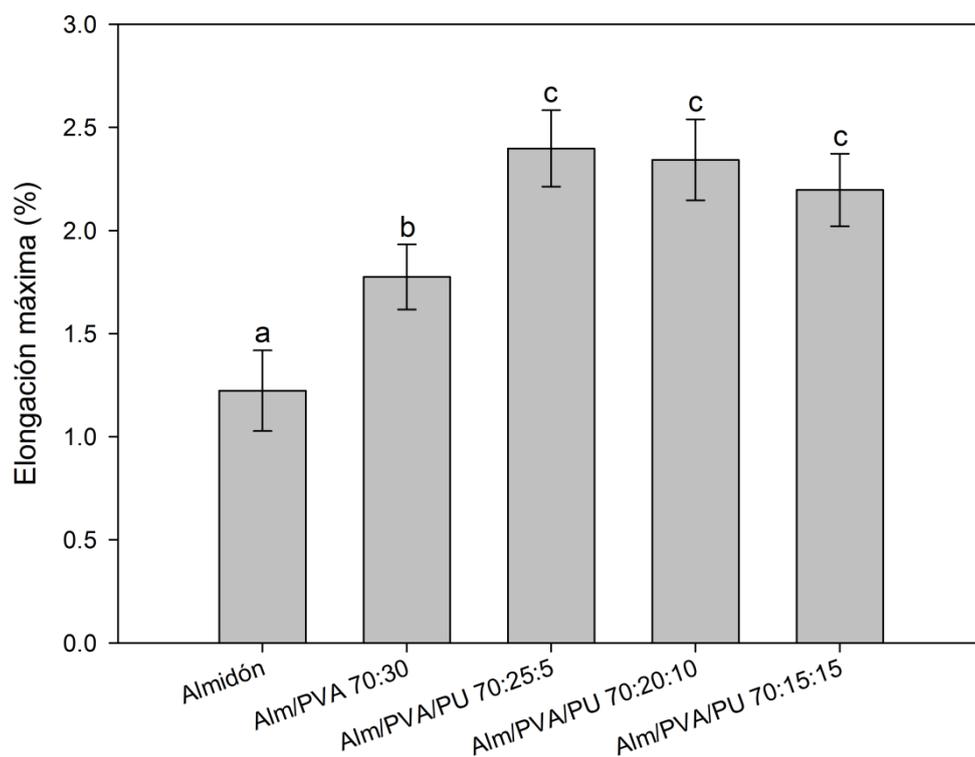
En el almidón gelatinizado, las cadenas glucosídicas se encuentran predominantemente en estado amorfo (baja cristalinidad), lo que produce que los patrones de rayos-X presenten alto ruido (Frost y col., 2009). De acuerdo con Wu y col. (2004), los espectros de difracción de rayos-X de almidón de maíz presentan picos de  $2\theta$  a 14,88; 17,08; 17,98; 19,98 y 22,78° correspondientes a la región cristalina de almidón tipo A. En este tipo compacto de paquete cristalino de las dobles hélices hay un bajo contenido de moléculas de agua y forma una celda unitaria del tipo monoclinico (Casarrubias-Castillo y col., 2012). Para las películas Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5 se pueden observar picos a aproximadamente 14° y 17°, pero para el caso de las películas Alm/PVA/PU 70:20:10 y 70:15:15 no se observan picos definidos, por lo cual se concluyó que la presencia de PU en cantidades mayores al 10 % indujo cambios que disminuyeron la cristalinidad de las muestras. Un comportamiento similar fue reportado por Ran y col. (2003) utilizando un poliéster como plastificante. Estos

autores también enunciaron que al reducir la cristalinidad de las muestras, se logra una mejora en las propiedades de procesamiento (modificación de la mezcla, *pelleting* y moldeo por soplado).

### 3.8.1.3.7. Propiedades mecánicas

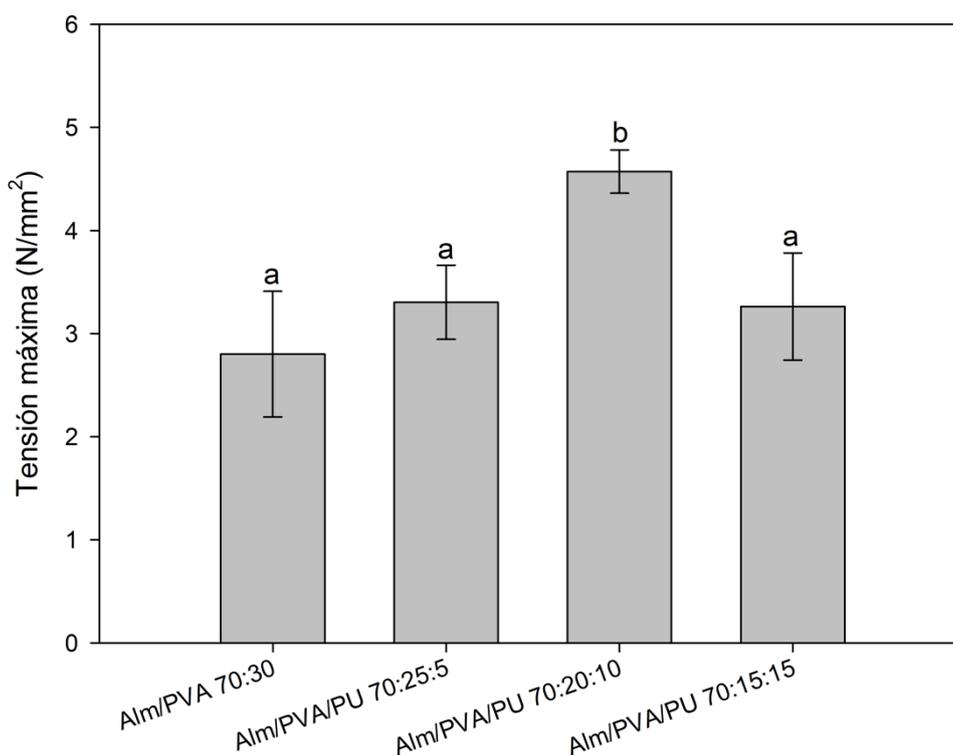
#### 3.8.1.3.7.1. Con texturómetro

Con los datos obtenidos a partir de los ensayos de películas con el texturómetro se obtuvo información de tensión máxima de ruptura y elongación máxima. La elongación máxima porcentual de las películas se presenta en la Figura 3.14. La incorporación de plastificantes al almidón produjo un aumento de la elongación máxima, mostrando una buena compatibilidad de los componentes y una efectiva plastificación (Chiellini y col., 2001b). Cuando se reemplazó parte del PVA por PU el aumento de elongación máxima fue estadísticamente mayor que cuando sólo se utilizó PVA, aunque no hubo diferencias significativas entre las tres relaciones PVA:PU.



**Figura 3.14.** Elongación máxima (%) de películas de almidón puro, Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con texturómetro. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

En la Figura 3.15 se muestran los resultados obtenidos para la tensión máxima de ruptura de las películas Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15. Los ensayos realizados con esta técnica tienden a tener mayor error aleatorio, lo cual en este caso provoca que no se puedan observar diferencias significativas en los valores excepto para la formulación Alm/PVA/PU 70:20:10. Es importante destacar que esta formulación presenta un valor de tensión mayor a las demás, lo que podría indicar una mayor interacción entre los componentes, mayor energía de cohesión y por ende mayor resistencia mecánica.



**Figura 3.15.** Tensión máxima de ruptura (N/mm<sup>2</sup>) de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con texturómetro. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

#### 3.8.1.3.7.2. Por Análisis Dinámico Mecánico

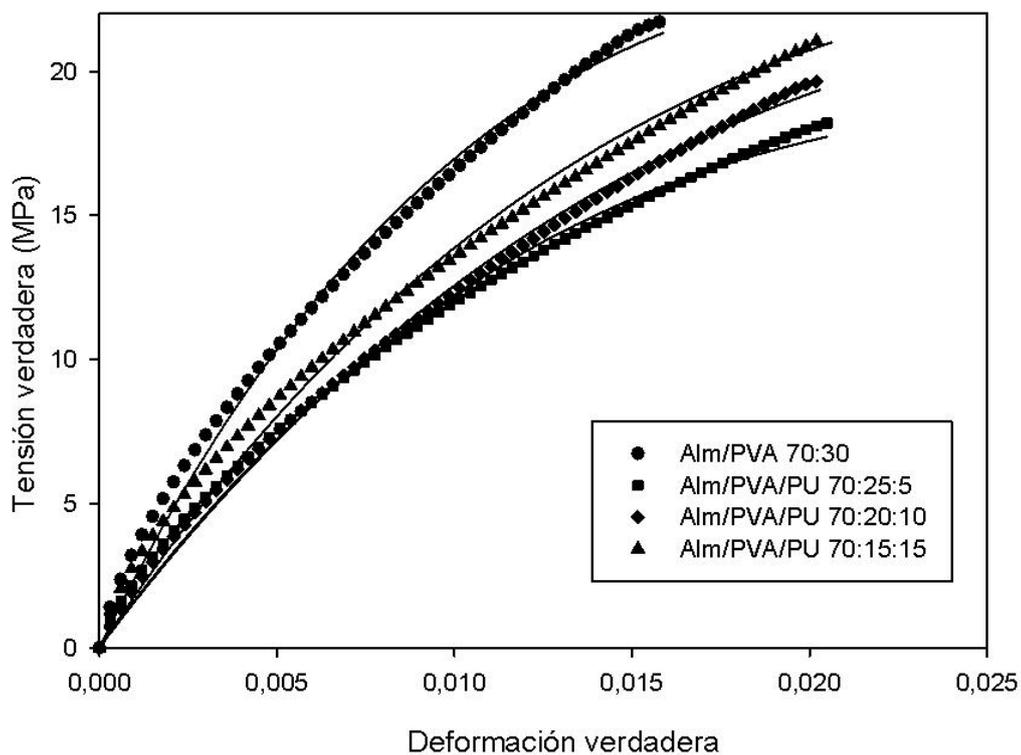
Debido a que, como se expresó en la sección anterior, los resultados de los ensayos mecánicos obtenidos con la técnica del texturómetro tienden a presentar mucha dispersión, se decidió realizar ensayos de tensión-deformación por análisis dinámico mecánico (DMA), donde se tuvo mayor control de las condiciones experimentales. Los datos obtenidos por esta técnica presentaron menor error aleatorio, por lo tanto, se decidió dar mayor peso a estos datos en la discusión de resultados.

El comportamiento mecánico de las películas se obtuvo a través de ensayos de tensión-deformación y las curvas resultantes se ajustaron a través de la Ecuación 5, que corresponde a un modelo matemático capaz de describir adecuadamente la curva de tensión-deformación (Mancini y col., 1999; Del Nobile y col., 2007):

$$\sigma_T = E_C \times \varepsilon_T \times e^{K\varepsilon_T} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $\epsilon_T$  y  $\sigma_T$  (MPa) son la deformación verdadera y la tensión verdadera (Mancini y col., 1999),  $E_C$  (MPa) es el módulo elástico (la tangente de la curva tensión-deformación en el origen), y  $K$  es una constante utilizada como parámetro de ajuste.

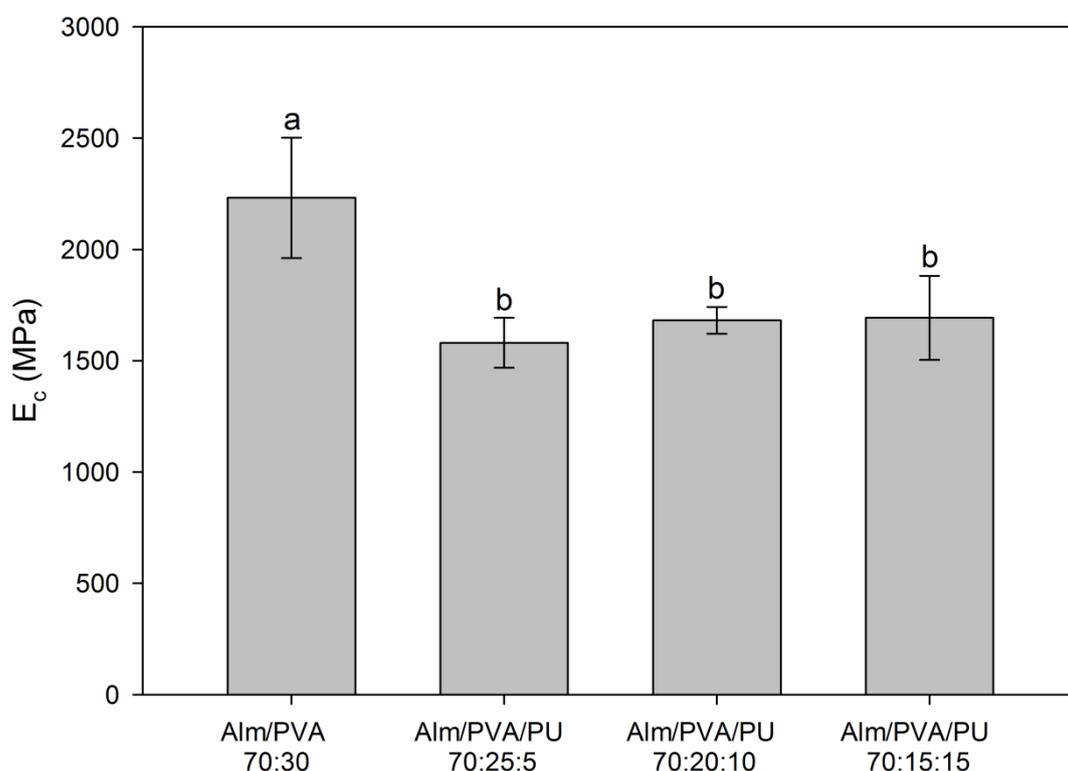
Las películas se ensayaron a una temperatura fija de 25 °C. El modelo utilizado para estimar el módulo elástico ajustó los datos experimentales satisfactoriamente ( $R^2 > 0,99$ ), como se observa en la Figura 3.16, donde se muestra el comportamiento mecánico de algunas de las películas ensayadas a modo de ejemplo. Como se puede observar en esta Figura, todas las películas conteniendo PU presentaron un valor de tensión verdadera entre 15 y 20 MPa. También se observó que las películas conteniendo PU alcanzaron mayores valores de deformación antes de la ruptura.



**Figura 3.16.** Propiedades mecánicas de películas de Alm/PVA 70:30 y las mezclas Alm/PVA/PU evaluadas a 25°C por DMA. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las líneas al modelo (Ecuación 5).

La relación entre tensión y deformación, que se corresponde con el módulo elástico, se estimó para todos los casos, permitiendo caracterizar la región

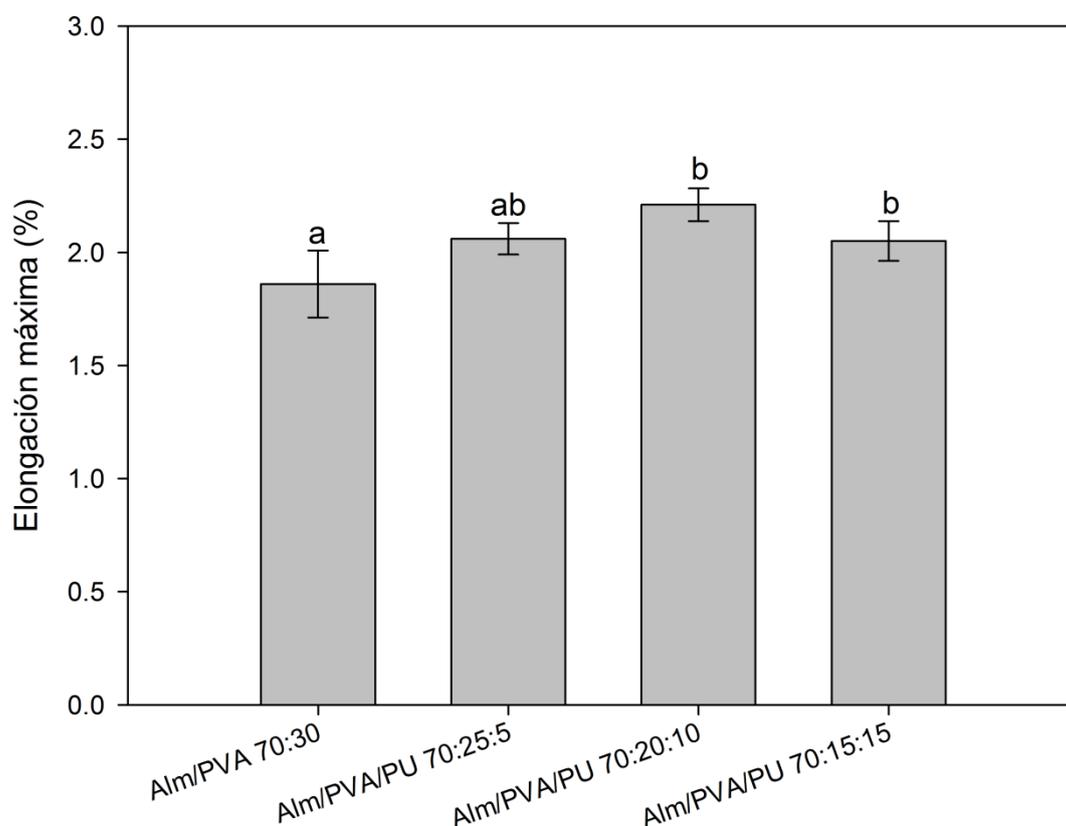
elástica de las curvas, para lo cual los puntos inmediatamente posteriores a la ruptura de las películas no se tuvieron en consideración para poder obtener un mejor ajuste de los puntos experimentales a deformaciones iniciales e intermedias. Los valores obtenidos de  $E_c$  para las diferentes películas estudiadas se muestran en la Figura 3.17.



**Figura 3.17.** Módulo elástico,  $E_c$ , de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

La flexibilidad, la ductilidad y la tenacidad de los polímeros se mejoran con el agregado de plastificantes. Su presencia tiende a aumentar la extensibilidad y reducir la fragilidad de la matriz polimérica evitando la formación de poros y fisuras (García y col., 2000). En este caso, se observa que la incorporación de PU en reemplazo de parte del PVA generó una disminución significativa del módulo elástico, indicando que el PU resultó un plastificante efectivo (Chiellini y col., 2001b).

Por otro lado se realizó el análisis de los datos de elongación máxima obtenidos por esta técnica. Los resultados se muestran en la Figura 3.18.



**Figura 3.18.** Elongación máxima (%) de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con Análisis Dinámico Mecánico en modo tensión-deformación. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

En este caso se puede hacer una comparación con los datos obtenidos con el texturómetro, y se observa que, con ambas técnicas, la elongación máxima obtenida fue la misma para las tres formulaciones con PU, pero no son todas significativamente distintas a la elongación de la película Alm/PVA 70:30. La formulación Alm/PVA 70:30 presenta una elongación máxima menor e igual a la de las películas Alm/PVA/PU 70:25:5. Nuevamente se observa que la incorporación de PU contribuye a la plastificación de las mezclas al reemplazar parcialmente al PVA.

### 3.8.1.3.8. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La permeabilidad al vapor de agua es un proceso controlado por los fenómenos de disolución y difusión, por lo que es gobernado no solo por la concentración y la estructura química de los componentes, sino también por la movilidad de las cadenas, que a su vez es dependiente de las fuerzas intermoleculares, el grado de entrecruzamiento y el grado de cristalinidad.

La permeabilidad al vapor de agua se estudió para los sistemas Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15. Para realizar los cálculos se obtuvo la pendiente de cada curva de los gráficos de peso en función del tiempo.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.8, y se incluye el dato de WVP para películas de almidón puro para fines comparativos (García y col., 2009).

**Tabla 3.8.** Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) obtenidos para las distintas formulaciones de películas.

<b>Formulación</b>	<b>WVP x 10<sup>-11</sup> (g.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup>)</b>
Almidón puro	17,660 <sup>a</sup>
Alm/PVA 70:30	0,065 <sup>b</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5	0,089 <sup>b</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10	0,081 <sup>b</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15	0,103 <sup>b</sup>

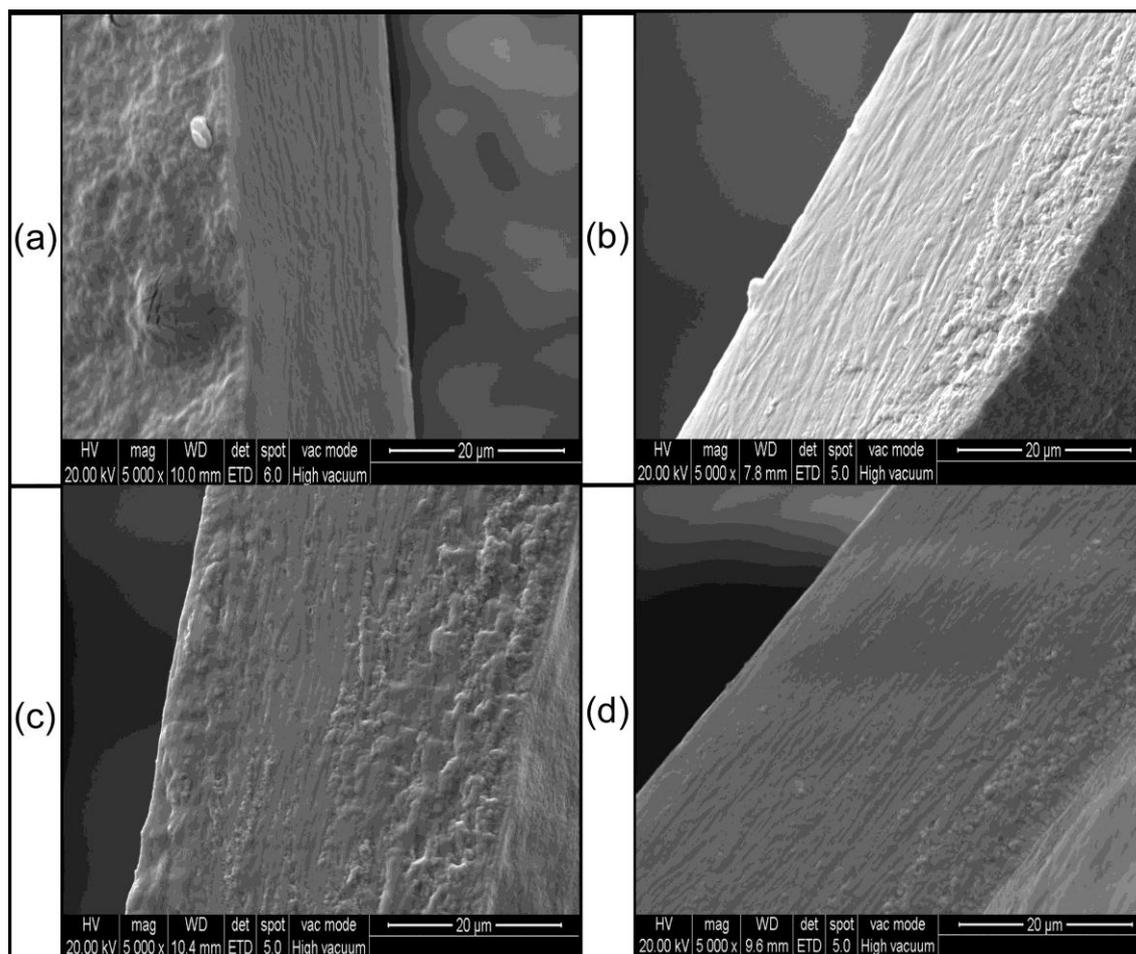
Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Se encontró que el agregado de PVA o PVA/PU produjo un descenso importante en el valor de la permeabilidad al vapor de agua (WVP). Este hecho tiene relación con que la adición de PVA (o PVA/PU) introduce un camino tortuoso para que las moléculas de agua logren atravesar la película, como se reporta en otros trabajos (Ghanbarzadeh y col., 2010). Mientras más largo sea el camino difusivo que deben penetrar las moléculas, menor será la permeabilidad resultante. En bajas cantidades, el PU probablemente se dispersa bien en la matriz de almidón, bloqueando la transmisión de vapor de agua. Esto indicaría también la formación de un sistema más compacto como consecuencia del efecto

compatibilizante del PVA (o PVA/PU), reduciendo de esa manera el espacio intercatenario y por ende dificultando la difusión de las moléculas de agua.

### 3.8.1.3.9. *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de secciones de criofractura de las películas se muestran en la Figura 3.19.



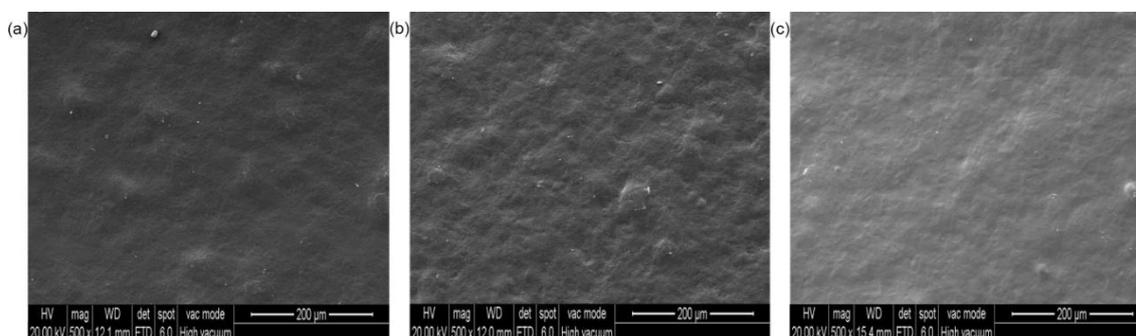
**Figura 3.19.** Imágenes SEM (5000x) de cortes transversales de películas de Alm/PVA 70:30 (a), Alm/PVA/PU 70:25:5 (b), Alm/PVA/PU 70:20:10 (c) y Alm/PVA/PU 70:15:15 (d). Escala: 20 µm.

En todos los casos se observan superficies lisas y sin huecos. La micrografía SEM para Alm/PVA 70:30 muestra que la estructura del almidón fue completamente modificada, y se puede observar como consecuencia de esto una fase continua que implica una alta compatibilidad entre el almidón y el PVA,

logrando una matriz poco estructurada, con menos interacciones almidón-almidón (Cinelli y col., 2006).

Las películas de mezclas almidón/PVA/PU muestran superficies de fractura casi lisas, sin evidencia de separación de fases. Esto se atribuyó a la buena compatibilidad entre los componentes de la formulación a través de uniones puente de hidrógeno entre los grupos uretano del PU y los grupos hidroxilo del almidón, y las uniones de hidrógeno en la interfase entre el PVA, el almidón y el PU (Lu y col., 2005).

La Figura 3.20 muestra las micrografías de la superficie cara aire de películas Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU 70:20:10. Las micrografías de la cara sustrato (no mostradas) fueron lisas en todos los casos.



**Figura 3.20.** Imágenes de SEM de superficie de películas Alm/PVA 70:30 (a), Alm/PVA/PU 70:25:5 (b), Alm/PVA/PU 70:20:10 (c). Escala: 200 µm.

Se puede observar que las superficies de las películas Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5 mostraron una cierta rugosidad, mientras que la película Alm/PVA/PU 70:20:10 presentó una superficie más lisa, por lo que el reemplazo de PVA por PU a partir de un 10 % ayuda a la obtención de una película más homogénea ya que la movilidad del PU facilita el proceso de coalescencia.

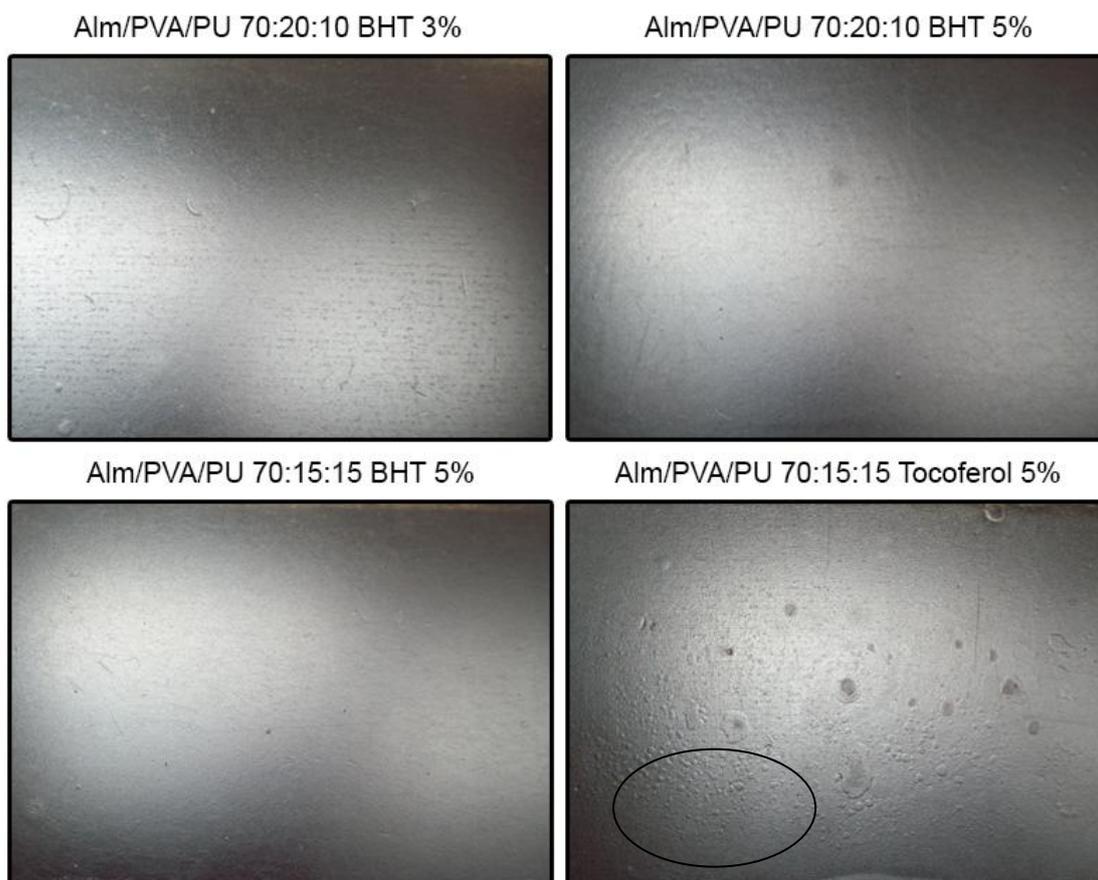
### 3.8.2. Películas aditivadas con antioxidantes

Dada la cantidad de variables que se introducen al incorporar un aditivo, y teniendo en cuenta las potenciales aplicaciones como recubrimiento alimentario, se consideró que estudiar las propiedades mecánicas era fundamental para establecer la potencial aplicación de las películas con antioxidantes. Por lo tanto se estudió como la incorporación del aditivo podía modificar o introducir nuevas

interacciones en la matriz. Se complementó esta sección con el análisis por espectroscopia infrarroja.

### 3.8.2.1. Incorporación de aditivos

El agregado de las soluciones de BHT al 3 y 5 % p/p y de  $\alpha$ -tocoferol al 1, 3 y 5 % p/p a la dispersión formadora de película se realizó sin afectar la estabilidad de la dispersión polimérica. Las películas obtenidas, en el caso del BHT, no presentaron separación de fases o poros macroscópicos en ambas concentraciones estudiadas. Las películas con 1% de  $\alpha$ -tocoferol tampoco presentaron irregularidades a simple vista; en cambio, en las películas conteniendo 3 y 5 % se observó la presencia de fallas y la segregación de algún componente fue evidente, como se observa en la Figura 3.21, donde se muestran algunas películas aditivadas.



**Figura 3.21.** Fotografías a contraluz de películas con antioxidantes BHT y  $\alpha$ -tocoferol. La elipse indica segregación de  $\alpha$ -tocoferol en forma de gotas de aceite.

### 3.8.2.2. Propiedades mecánicas

Debido a cuestiones de disponibilidad de los equipos de DMA y texturómetro para realizar los ensayos con las diferentes técnicas, para el análisis de las películas aditivadas se debió recurrir únicamente al estudio de las muestras por texturómetro.

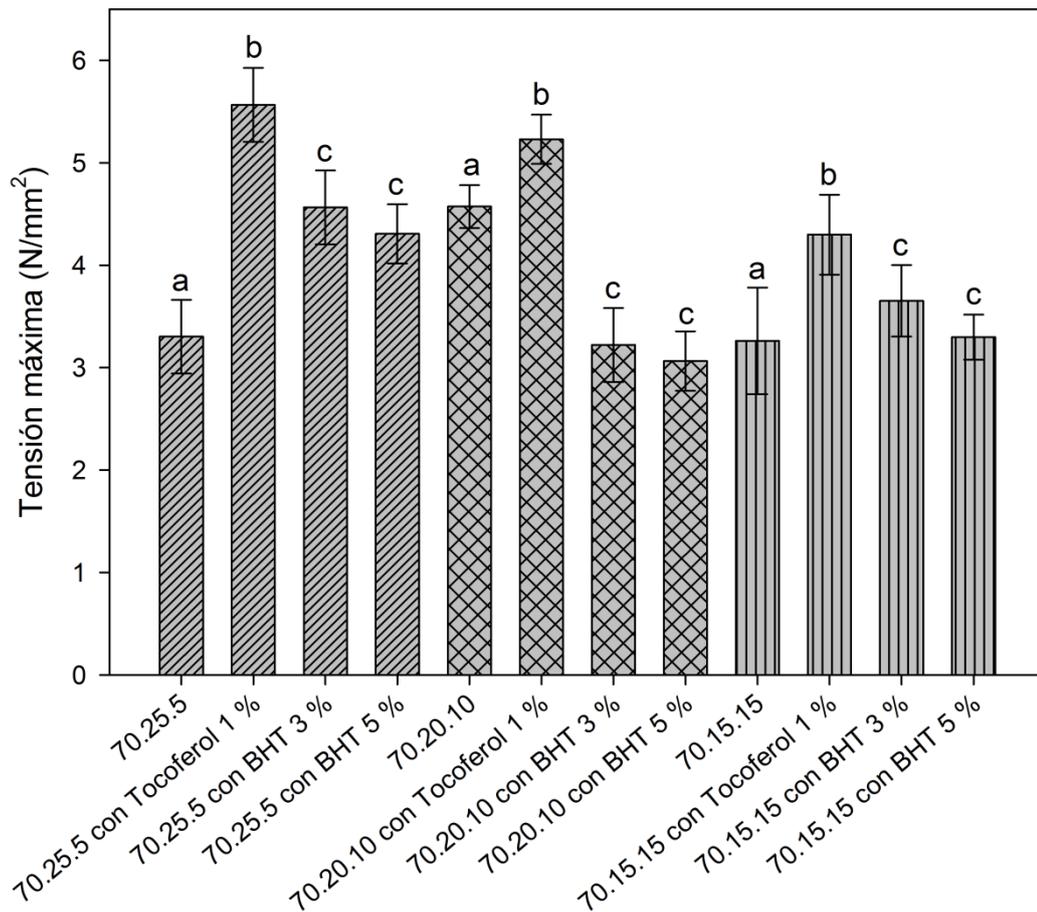
#### 3.8.2.2.1. Con texturómetro

Previamente en la sección 3.8.1.2.6.1. se analizaron las propiedades mecánicas de las películas de base con esta técnica, encontrando que, respecto de la tensión máxima de ruptura, la inclusión de PU no produjo cambios para las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 y 70:15:15, pero sí presentó un máximo para la relación PVA/PU 20:10.

Es importante tener en cuenta que el  $\alpha$ -tocoferol se comporta como un plastificante cuando es agregado a polímeros vinílicos, pero, a diferencia de lo que ocurre en la matriz bajo estudio que contiene PU H<sub>12</sub>MDI, almidón y PVA, los polímeros vinílicos son principalmente hidrofóbicos y, en esos casos, el tocoferol puede integrarse fácilmente. En este caso, la característica polar de las cadenas poliméricas no permite una adecuada distribución del aditivo, generando “gotas” o “islas” del mismo y afectando, así, las propiedades mecánicas. Por este motivo no se pudieron analizar las películas correspondientes a la incorporación de 3 y 5 % de  $\alpha$ -tocoferol, ya que la segregación era muy importante y la película poseía fallas y poros como se puede observar en la Figura 3.21.

Se estudiaron los efectos del agregado de antioxidantes sobre la tensión máxima de ruptura, el módulo elástico y la elongación máxima porcentual (Figuras 3.22, 3.23 y 3.24).

El espesor y la discontinuidad de las películas poliméricas aditivadas con antioxidantes (debido a poros o fisuras que no son ópticamente visibles), pueden afectar negativamente las propiedades mecánicas por la generación de sitios de inicio de los fenómenos de ruptura. Esto puede tener incidencia particularmente en los resultados de tensión máxima de ruptura, pero se consideró más representativa la discusión sobre los resultados de módulo elástico y elongación máxima.



**Figura 3.22.** Tensión máxima de ruptura (N/mm<sup>2</sup>) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

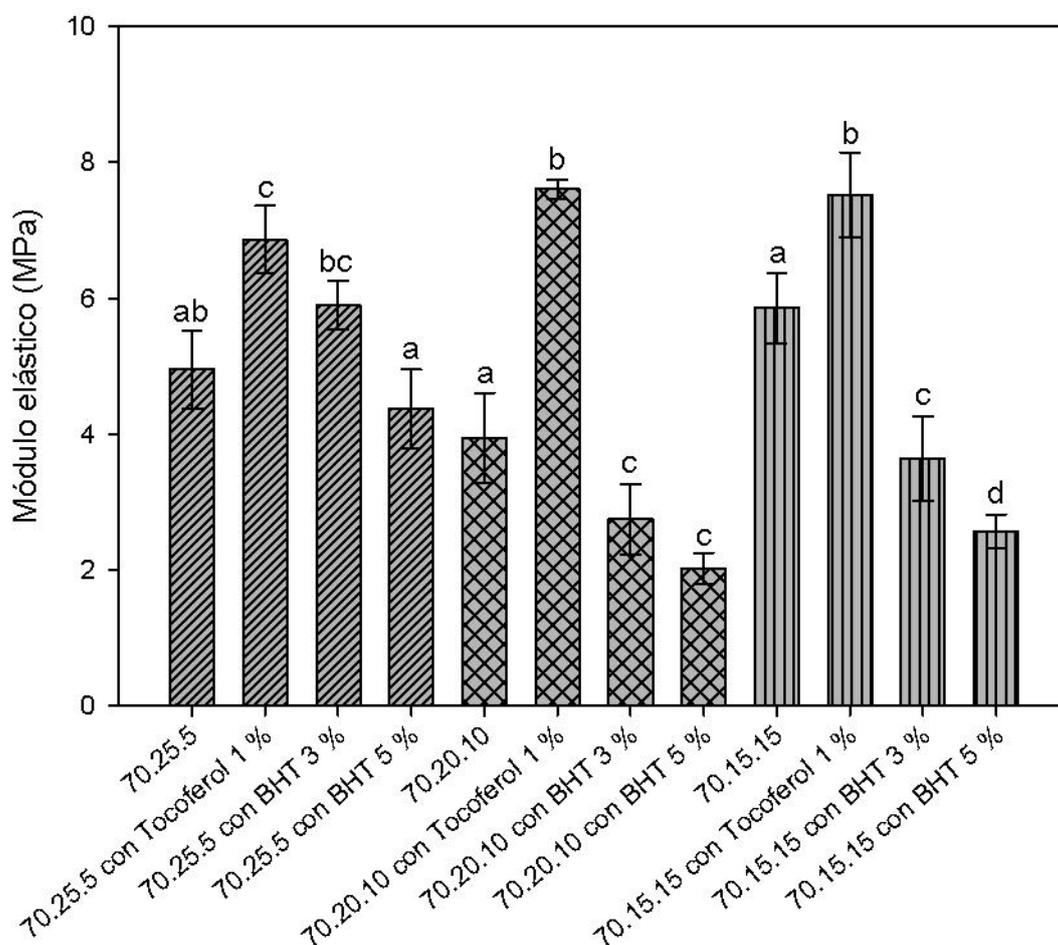
Para la tensión máxima de ruptura (Figura 3.22) el análisis estadístico se realizó por grupos según formulación (en el gráfico por patrón de sombreado) resultando que:

- en todos los casos se encontró un aumento significativo del valor de tensión máxima cuando se incorporó a la formulación 1 % p/p de  $\alpha$ -tocoferol.
- cuando se incorporó a las formulaciones BHT, se produjo también un aumento del valor de tensión máxima de ruptura con respecto a las películas de base (excepto para la relación Alm/PVA/PU 70:20:10), pero no hubo diferencia significativa entre los dos porcentajes de BHT (3 y 5 %).

- el aumento de tensión máxima de ruptura en  $N/mm^2$  fue estadísticamente menor para el BHT en ambas cantidades que cuando se adicionó  $\alpha$ -tocoferol al 1 %.

Los resultados obtenidos estarían indicando que la incorporación de antioxidantes perturba la estructura de las películas.

En el caso del módulo elástico, los resultados dependieron de la formulación utilizada, y se muestran en la Figura 3.23 (estadística según patrón de sombreado)



**Figura 3.23.** Módulo elástico (MPa) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %.

Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

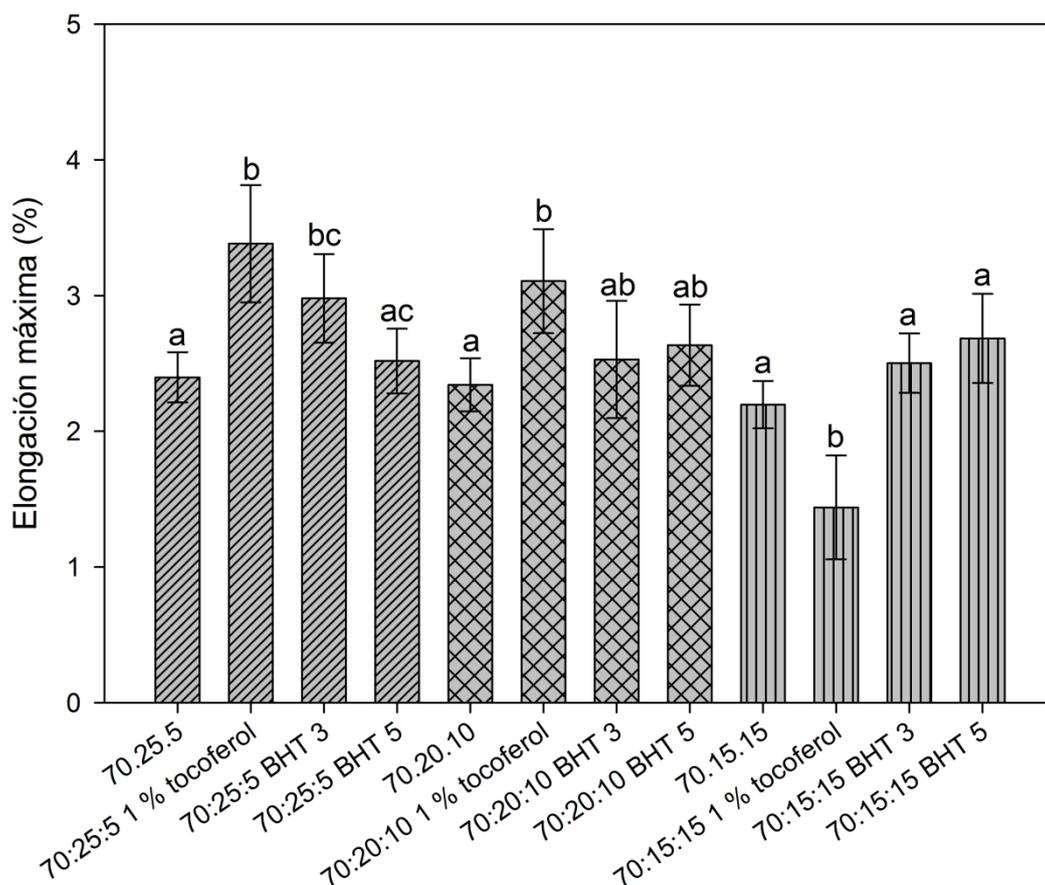
Para todas las películas compuestas se encontró que el agregado de  $\alpha$ -tocoferol al 1 % p/p provocó un aumento del valor del módulo respecto de las

películas de base, lo que estaría indicando que la presencia de  $\alpha$ -tocoferol contribuye a las interacciones entre los componentes.

Para las películas Alm/PVA/PU 70:20:10 el agregado de BHT al 3 % p/p produjo el mismo efecto de disminución del módulo que el agregado de BHT al 5 % p/p respecto de la película sin antioxidante.

Las películas Alm/PVA/PU 70:15:15 también mostraron diferencias significativas cuando se le agregó tanto  $\alpha$ -tocoferol como BHT, siendo estos valores menores en todos los casos que la película de base, evidenciando que la presencia del aditivo perturba las interacciones entre cadenas de almidón, PVA y PU.

En la Figura 3.24 se presentan los resultados obtenidos para las formulaciones con y sin antioxidantes respecto de la elongación máxima de ruptura porcentual. Al igual que en los gráficos anteriores, los datos estadísticos se presentan por grupo según el patrón de sombreado.



**Figura 3.24.** Elongación máxima de ruptura (%) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Para las formulaciones Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU 70:20:10 el agregado de 1 % de  $\alpha$ -tocoferol provocó un aumento en la elongación máxima, a diferencia de lo que ocurrió con la formulación 70:15:15 en donde el valor de elongación máxima disminuyó. Estos resultados son similares a los presentados para módulo elástico, mostrando que en la película 70:15:15 la presencia del aditivo perturba las interacciones entre las cadenas de almidón, PVA y PU.

Con respecto al agregado de BHT, en todos los casos, al igual que sucedía con el módulo elástico, el uso de 3 o 5 % del antioxidante provoca el mismo efecto; por otra parte en general no difiere de lo obtenido para las películas de base en cada caso.

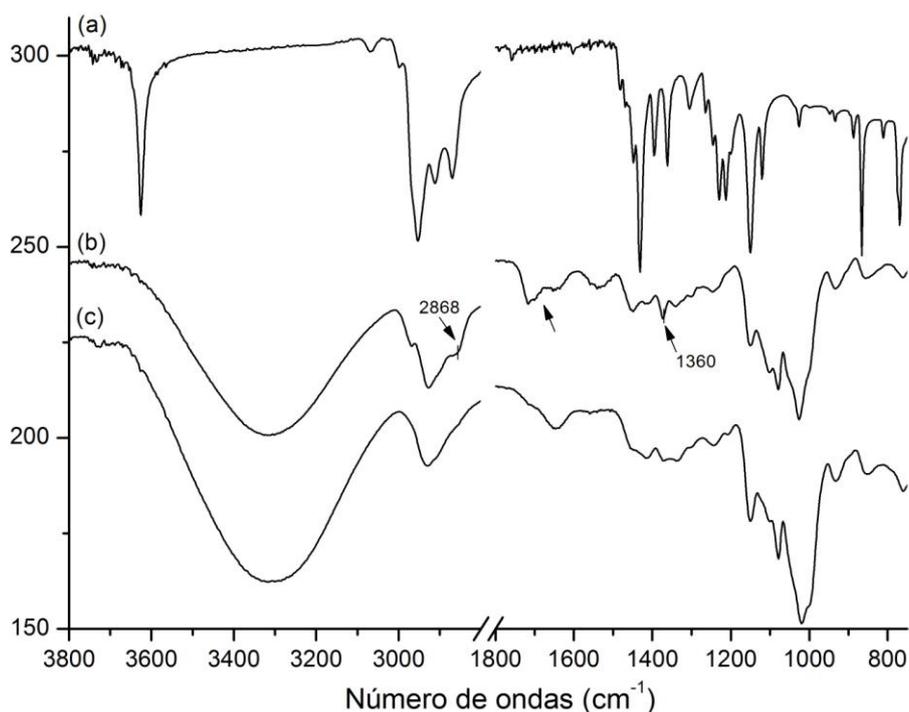
Los resultados obtenidos para módulo elástico y elongación máxima indican que con el agregado de BHT no se producen grandes cambios, con lo

cual siguen siendo un potencial sistema de recubrimiento activo para alimentos sin sacrificar las propiedades mecánicas (Anbinder y col., 2016). Con  $\alpha$ -tocoferol los cambios son mayores, y no tienen una tendencia definida; lo observado seguramente tiene que ver con lo expresado anteriormente sobre la compatibilidad del  $\alpha$ -tocoferol con la matriz polimérica en estudio.

### 3.8.2.3. Espectroscopia FT-IR

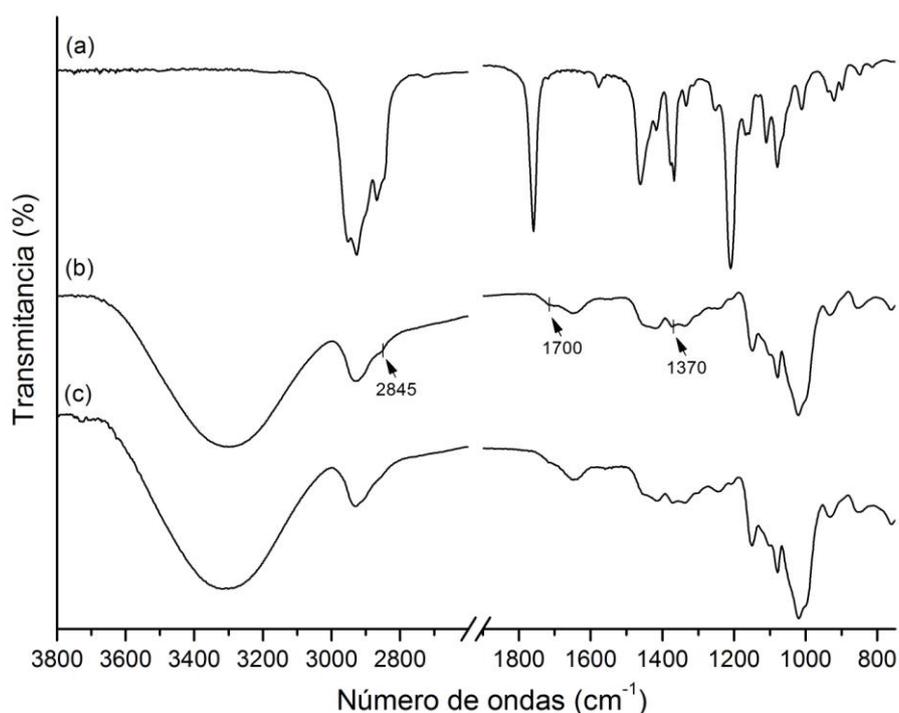
El estudio por espectroscopia infrarroja de las películas aditivadas, permite no sólo verificar la presencia de los diferentes aditivos en la película mediante la aparición de bandas características de los mismos en el espectro, sino también aportar información acerca de las posibles interacciones con la matriz polimérica.

En las Figuras 3.25 y 3.26 se presentan los espectros de películas de Alm/PVA/PU 70:20:10 con y sin antioxidantes. Se muestran los resultados para películas conteniendo 3 % de BHT y 1 % de  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 3.25.** Espectros FTIR de (a) BHT puro, (b) Alm/PVA/PU 70:20:10 BHT 3%, (c) Alm/PVA/PU 70:20:10.

En el caso de las películas aditivadas con BHT, se observa en el espectro una ligera modificación en la relación de intensidades de las bandas correspondientes a los grupos C-H ( $3000$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$ ), debido al aporte de los diferentes grupos metilenos de BHT a la absorbancia en esta región del espectro. No se observa en la película aditivada la banda perteneciente al grupo  $\text{-OH}$  fenólico del BHT ( $3625\text{ cm}^{-1}$ ). Por otra parte también se puede ver que se incrementa el valor de intensidad de la banda a  $1700\text{ cm}^{-1}$  y la banda  $1666\text{ cm}^{-1}$  se ve modificada, lo que podría estar indicando una posible interacción entre los grupos carbonilo del BHT y los componentes de la película a través de puentes de hidrógeno. Por último, la película aditivada presenta una banda característica de los movimientos de flexión de los C-H de la molécula BHT a aproximadamente  $1360\text{ cm}^{-1}$  (Anbinder, 2011).



**Figura 3.26.** Espectros FTIR de (a)  $\alpha$ -tocoferol puro, (b) película Alm/PVA/PU 70:20:10 aditivada con 1 % de  $\alpha$ -tocoferol y (c) película Alm/PVA/PU 70:20:10.

En la película aditivada con 1% de  $\alpha$ -tocoferol, se observa la aparición de un hombro a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la deformación del anillo de benceno

de  $\alpha$ -tocoferol (observado en el espectro del antioxidante puro a  $1758\text{ cm}^{-1}$ ), corrimiento que podría estar indicando una interacción a través de puentes de hidrógeno entre el antioxidante y los componentes de la película. Se puede observar en la Figura una modificación en la relación de intensidades de las bandas correspondientes a los grupos C-H ( $3000$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$ ), debido al aporte de los diferentes grupos metilenos del antioxidante. También aparece una pequeña banda proveniente del  $\alpha$ -tocoferol a  $1370\text{ cm}^{-1}$ , asignada a los movimientos de flexión de los C-H (Anbinder, 2011; Anbinder y col., 2016).

### 3.8.3. Películas aditivadas con antifúngicos

#### 3.8.3.1. *Películas aditivadas con sorbato de potasio*

La caracterización de películas aditivadas con sorbato de potasio no se llevó a cabo ya que se comprobó en primera instancia su capacidad antifúngica frente a las cepas de interés para los objetivos del trabajo, encontrándose que este compuesto no es efectivo (ver sección 4.5.3.2).

#### 3.8.3.2. *Películas aditivadas con natamicina*

Todos los ensayos de caracterización de películas aditivadas con natamicina se realizaron con natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1.

En la Figura 3.27 se muestra una fotografía de una película conteniendo natamicina al 1 % p/p. Como se puede observar, la película no presenta poros ni fisuras, y es homogénea. Esta característica se mantuvo para todas las formulaciones.



**Figura 3.27.** Fotografía de una película de Alm/PVA/PU 70:20:10 aditivada con 1 % de natamicina.

#### 3.8.3.2.1. Contenido de humedad

En la Tabla 3.9 se muestra el contenido de agua residual en las películas aditivadas con 1 % p/p de natamicina.

**Tabla 3.9.** Contenido porcentual de agua de películas con 1% p/p de natamicina.

<b>Formulación</b>	<b>Contenido de agua (%)</b>
Alm/PVA 70:30 1 % nat.	9,9 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5 1 % nat.	10,4 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10 1 % nat.	9,8 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15 1 % nat.	10,2 <sup>a</sup>

Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Todas las formulaciones presentaron un contenido de agua estadísticamente similar cercano al 10 %.

### 3.8.3.2.2. Grado de hinchamiento en el equilibrio

En la Tabla 3.10 se presentan los valores de grado de hinchamiento (%) para las películas sin natamicina y con natamicina al 1 % p/p.

**Tabla 3.10.** Valores de grado de hinchamiento obtenidos para las distintas formulaciones de películas con 1% p/p de natamicina (t=24 hs).

<b>Formulación</b>	<b>Sin natamicina</b>	<b>Con natamicina 1 % p/p</b>
Alm/PVA 70:30	9,44 <sup>a</sup>	6,23 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5	9,61 <sup>a</sup>	6,71 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10	7,46 <sup>b</sup>	6,13 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15	6,12 <sup>c</sup>	5,30 <sup>a</sup>

Letras iguales en cada columna indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Como se discutió anteriormente en la sección 3.8.1.2.8., las películas sin natamicina presentaron diferentes grados de hinchamiento en función del reemplazo de PVA por PU, resultando en menores valores cuando las películas tienen mayor proporción de PU que tiene carácter hidrofóbico. Las películas conteniendo natamicina al 1 % p/p presentaron un comportamiento diferente en dos sentidos: por un lado todas poseen valores estadísticamente iguales de grado de hinchamiento; y por otro lado, esos valores son menores y estadísticamente diferentes en todos los casos a sus correspondientes formulaciones sin natamicina (comparación no mostrada en la Tabla 3.10).

La presencia de un grupo carboxílico en el anillo y un grupo amino en el resto de azúcar le confiere a la natamicina un carácter anfótero, con un punto isoeléctrico de alrededor de pH 6,5 (pKa 4-4,5, pKb 8,6) (Brik, 1981). La natamicina también se presenta como anfifílica, explicado por un largo extremo muy polar (grupo carboxílico y micosamina) y un anillo macrocíclico en el cual cada lado tiene diferentes propiedades (rigidez e hidrofobicidad para la estructura del tetraeno, flexibilidad e hidrofiliidad para el lado opuesto). Aunque se ha estudiado que la natamicina no forma estructura auto-asociadas en agua (Koontz y col., 2003), a diferencia de los antibióticos polienos con altos pesos moleculares como la anfotericina o la nistatina, presenta un comportamiento intermedio y una conformación rígida que debe ser tenida en cuenta a la hora de analizar los

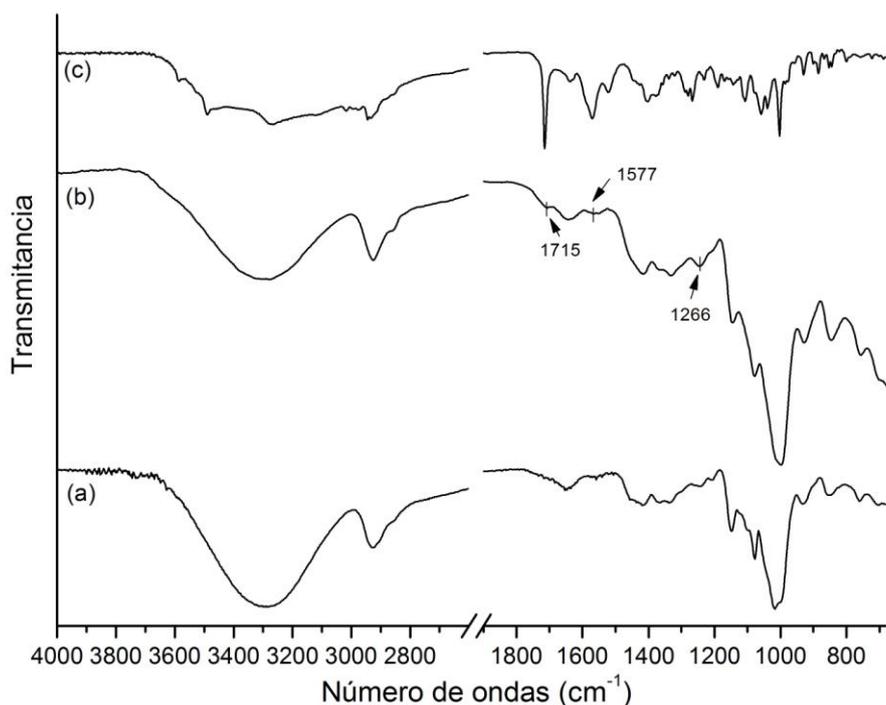
resultados. Particularmente esto último, sumado a su elevado peso molecular (665,73 g/mol) limita considerablemente la solubilización de la natamicina en agua o solventes. Por un lado, la presencia de grupos hidroxilo y grupos zwitteriónicos (ion-dipolo) hace que la natamicina sea insoluble o levemente soluble en algunos solventes como alcoholes, éteres, ésteres, hidrocarburos aromáticos o alifáticos o cetonas. Por el otro lado, la solubilidad en agua es muy pobre (20-50 ppm), principalmente a causa de la estructura de tetraeno, y puede ser mejorada por disolución en soluciones ácidas o alcalinas con la natamicina siendo activa contra hongos en el rango de pH entre 4 y 9. Sólo se han encontrado niveles de solubilización elevados para algunos solventes polares como metanol, dimetilsulfóxido, glicerol y propilenglicol (Thomas, 1976; Brik, 1981).

La solubilidad y la naturaleza anfótera de la natamicina puede ser comprendida si se mira este antibiótico como dos cadenas: la cadena que contiene los cuatro dobles enlaces es completamente hidrofóbica, mientras que la cadena con los dos grupos hidroxilo tiene una cara hidrofílica y una hidrofóbica, causando que la cadena sea anfifílica. El extremo polar de la cadena anfifílica contiene los grupos carboxilo y micosamina. El otro extremo es mayormente no polar con sólo un grupo hidroxilo. La natamicina forma una estructura cilíndrica ya que se alinean los grupos hidroxilo de la cadena anfifílica entre sí. El exterior del cilindro es completamente no polar (Thomas, 1976).

Al observar los valores de grado de hinchamiento de las películas con y sin natamicina, se ve que las que contienen natamicina absorben menos agua dado que la parte hidrofílica de la molécula de natamicina probablemente interacciona con la parte hidrofílica de las moléculas de almidón y PVA, haciendo que la película se torne más hidrofóbica.

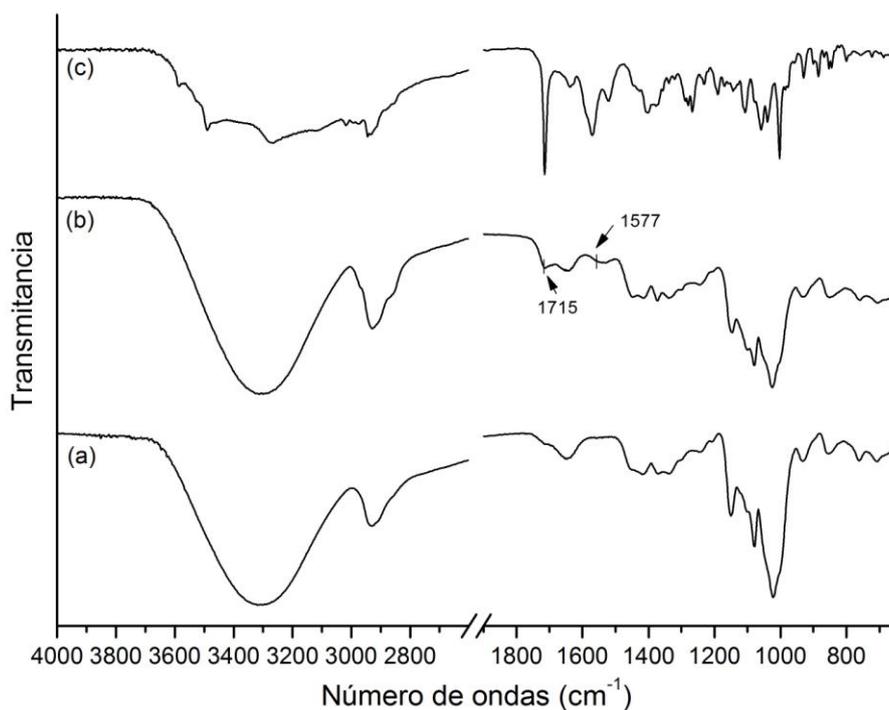
#### 3.8.3.2.3. Espectroscopia FTIR. Modo ATR

Los espectros presentados fueron obtenidos por ATR, excepto el de natamicina que se obtuvo por transmisión con pastilla de KBr. Las películas cargadas con natamicina en cada formulación se ensayaron del lado de la película que mostró contener mayor presencia de natamicina (ver sección 4.5.1.3).



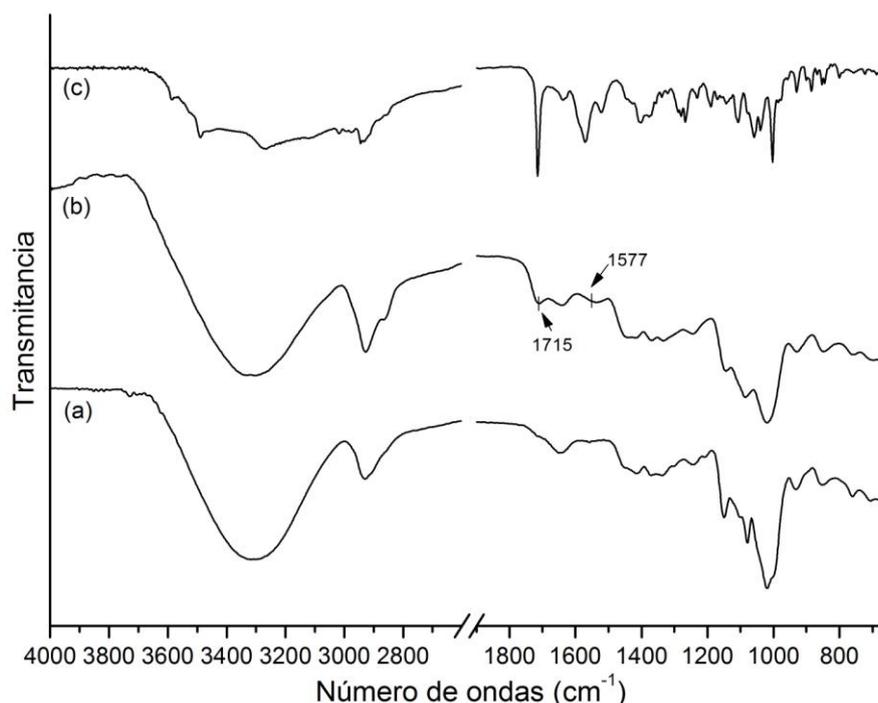
**Figura 3.28.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA 70:30, (b) Película Alm/PVA 70:30 cara sustrato con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

Para la película Alm/PVA 70:30 en la cara sustrato conteniendo 1 % de natamicina se observa en la Figura 3.28 un ensanchamiento de la banda de los OH por el aporte de la natamicina que en esa zona tiene además la contribución de la deformación del  $\text{NH}_2$  a  $3277 \text{ cm}^{-1}$ . Luego a  $1715 \text{ cm}^{-1}$  se observa la contribución del estiramiento de los carbonilos provenientes de los ésteres conjugados del anillo de lactona de la natamicina. En la zona de los  $1577 \text{ cm}^{-1}$  se puede ver una banda que corresponde al estiramiento del doble enlace carbono-carbono. También se destaca la banda correspondiente al anillo epoxi de la natamicina a  $1266 \text{ cm}^{-1}$  (Brik, 1981; Atta y col., 2012).



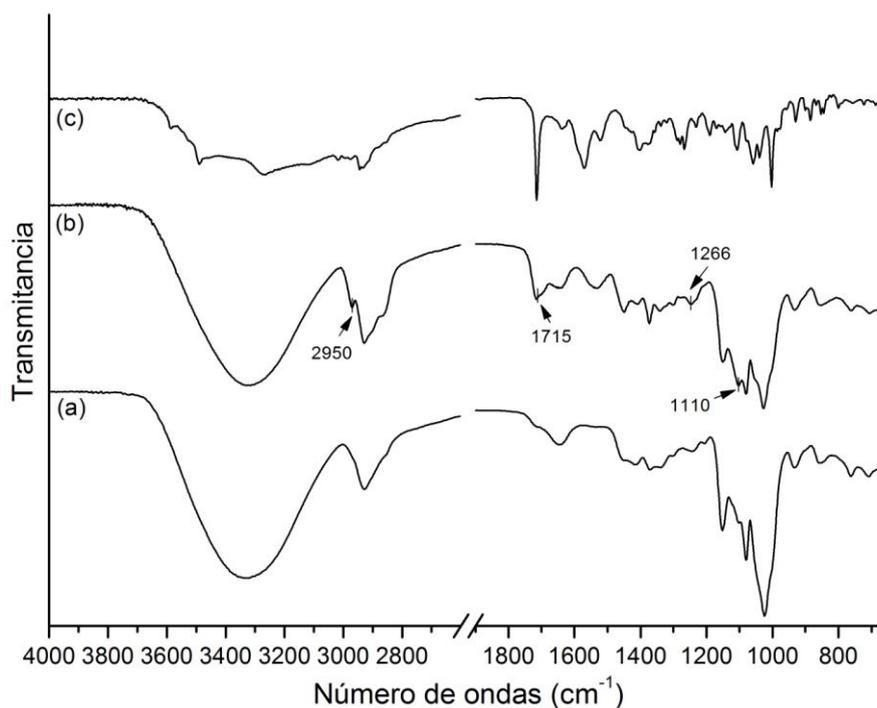
**Figura 3.29.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:25:5, (b) Película Alm/PVA/PU 70:25:5 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

Para el caso de las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU 70:20:10 (Figuras 3.29 y 3.30), se observa al igual que para la Alm/PVA 70:30, la banda a  $1715\text{ cm}^{-1}$  y también se puede ver la aparición de la banda alrededor de los  $1577\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del doble enlace  $\text{CH}=\text{CH}$ .



**Figura 3.30.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:20:10, (b) Película Alm/PVA/PU 70:20:10 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

Para la formulación Alm/PVA/PU 70:15:15 con natamicina al 1 % (Figura 3.31), entre los 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  se modifica el espectro mostrando cambios en esta zona que corresponde al estiramiento de los grupos CH, observándose particularmente el estiramiento de los grupos  $\text{CH}_2$  a 2950  $\text{cm}^{-1}$ . Al igual que para las otras películas, se observa un incremento de la intensidad de la banda a 1715  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los carbonilos de los ésteres conjugados del anillo de lactona de la natamicina. También muestra cambios en la zona entre 1500 y 1600, donde para las otras formulaciones se observaba el estiramiento del doble enlace C=H. Se puede observar la aparición de una banda a 1266  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a enlace epoxi entre  $\text{C}_4$  y  $\text{C}_5$  en la natamicina. A 1110  $\text{cm}^{-1}$  se aprecia la aparición de una banda que proviene del estiramiento asimétrico del enlace C-OH (Brik, 1981; Atta y col., 2012).

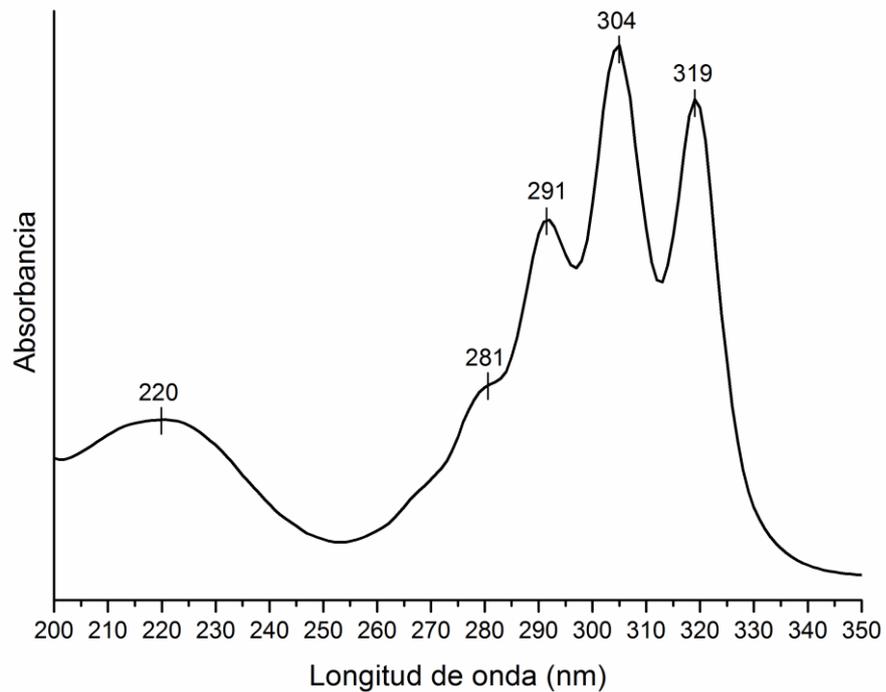


**Figura 3.31.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:15:15, (b) Película Alm/PVA/PU 70:15:15 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

En todos los casos se observa la aparición de bandas y corrimientos en el espectro, indicativos de interacciones entre los componentes de la película y la natamicina (Cé y col., 2012; Bierhalz y col., 2013).

#### 3.8.3.2.4. Espectrofotometría UV

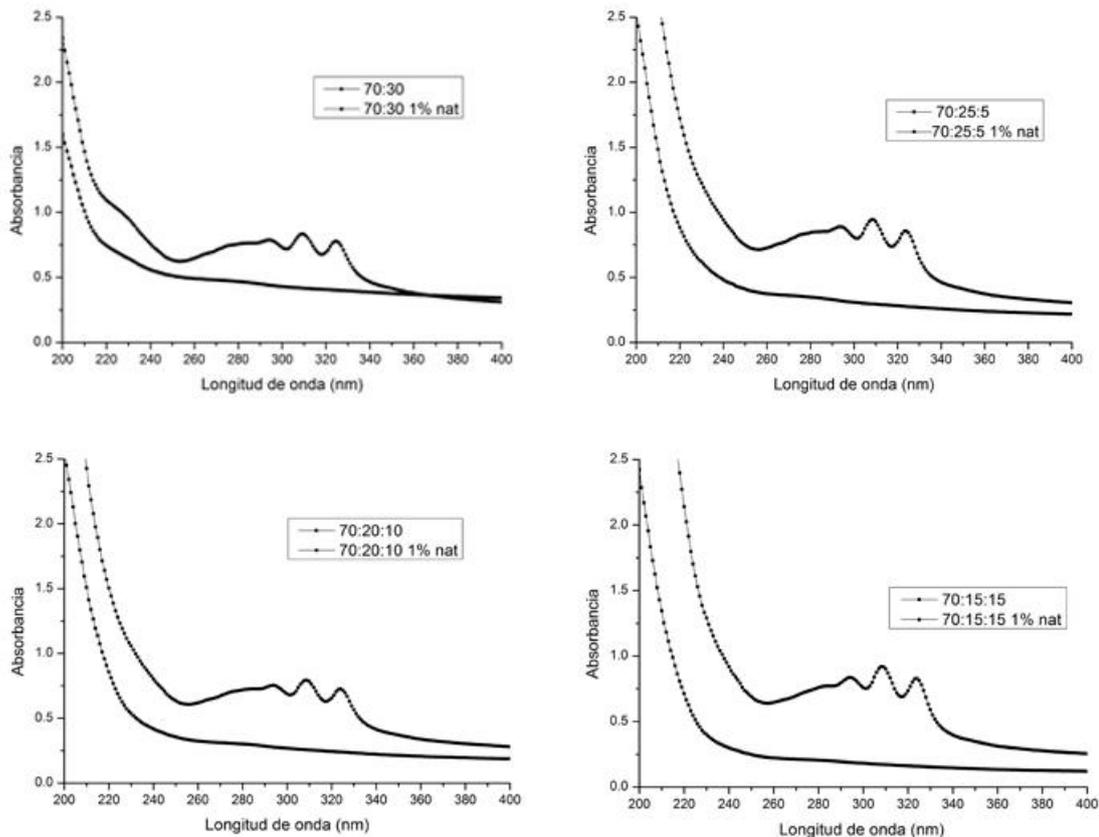
Se conoce que los máximos de absorbancia para natamicina pura son a 281, 291, 304 y 319 nm (Brik, 1981). En la Figura 3.32 se presenta el espectro UV para natamicina pura obtenido al 0,03 % en solución acuosa, entre 200 y 350 nm.



**Figura 3.32.** Espectro de absorción UV de natamicina en solución acuosa.

Previamente se presentaron los espectros UV-visible para las películas base (sección 3.8.1.2.3), los cuales mostraron sólo un hombro correspondiente al PVA alrededor de los 280 nm.

Los espectros en la zona UV de las películas Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina y sin ella se presentan en la Figura 3.33.



**Figura 3.33.** Espectros UV de películas de Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15 sin natamicina y con natamicina al 1 %.

Como se puede observar, cuando se adicionó natamicina a las películas se encontraron en todos los casos los picos característicos de la natamicina, aunque con ligeros corrimientos relacionados con las interacciones entre los componentes de la película y la natamicina.

### 3.8.3.2.5. Propiedades térmicas

#### 3.8.3.2.5.1. Calorimetría diferencial de barrido modulada (DSCm)

Las películas cargadas con natamicina al 1 % p/p no mostraron modificaciones en las temperaturas de transición vítrea con respecto a las películas sin aditivar.

### 3.8.3.2.5.2. *Análisis termogravimétrico (TGA)*

La Tabla 3.11 muestra los valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos  $T_5$ ,  $T_{50}$  y masa residual a 540°C para películas aditivadas con natamicina al 1 % p/p.

Para todas las formulaciones, el contenido de agua residual fue de un 10 % en peso aproximadamente, a diferencia de las películas sin natamicina que mostraban una disminución de este valor cuando se incorpora un 10 o 15 % de PU en reemplazo de PVA. Estos resultados referidos al porcentaje de agua residual de las películas están en concordancia con lo encontrado en la sección 3.8.3.2.1 al estudiar la humedad de las películas por secado en estufa. En otros trabajos, se encontró que el efecto del agregado de natamicina depende fuertemente de la naturaleza de la película, encontrando que la humedad de películas de pectina aumentó al incorporar natamicina, pero no hubo cambios significativos en este parámetro para películas de alginato (Bierhalz y col., 2012).

**Tabla 3.11.** Valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos  $T_5$ ,  $T_{50}$  y masa residual a 540 °C de películas aditivadas con 1 % de natamicina.

Composición de las películas	Agua residual (%p/p)	TID (°C)*	$T_5$ (°C)	$T_{50}$ (°C)	Residuo# (%p/p)
Almidón/PVA 70:30 1 % nat	10,0 <sup>a</sup>	240,0 <sup>a</sup>	105,8 <sup>b</sup>	344,8 <sup>a</sup>	14,7 <sup>a</sup>
Almidón/PVA/PU 70:25:5 1 % nat	10,5 <sup>a</sup>	240,0 <sup>a</sup>	96,73 <sup>ab</sup>	347,0 <sup>ab</sup>	10,3 <sup>b</sup>
Almidón/PVA/PU 70:20:10 1 % nat	10,2 <sup>a</sup>	233,5 <sup>a</sup>	96,0 <sup>ab</sup>	361,9 <sup>b</sup>	13,8 <sup>a</sup>
Almidón/PVA/PU 70:15:15 1 % nat	9,8 <sup>a</sup>	234,0 <sup>a</sup>	82,1 <sup>c</sup>	350,0 <sup>ab</sup>	14,6 <sup>a</sup>

\*TID: luego de la pérdida de agua.

#Masa residual a 540°C.

Letras iguales en cada columna indican medias iguales (test de Tukey  $\alpha=0,05$ ).

La masa residual a 540 °C presentó un mínimo para la mezcla Alm/PVA/PU 70:25:5, a diferencia de lo que sucedía con las películas sin aditivar en donde esta mezcla presentó un máximo de residuo. Los valores para las otras formulaciones son similares a los observados anteriormente para las mismas películas sin natamicina.

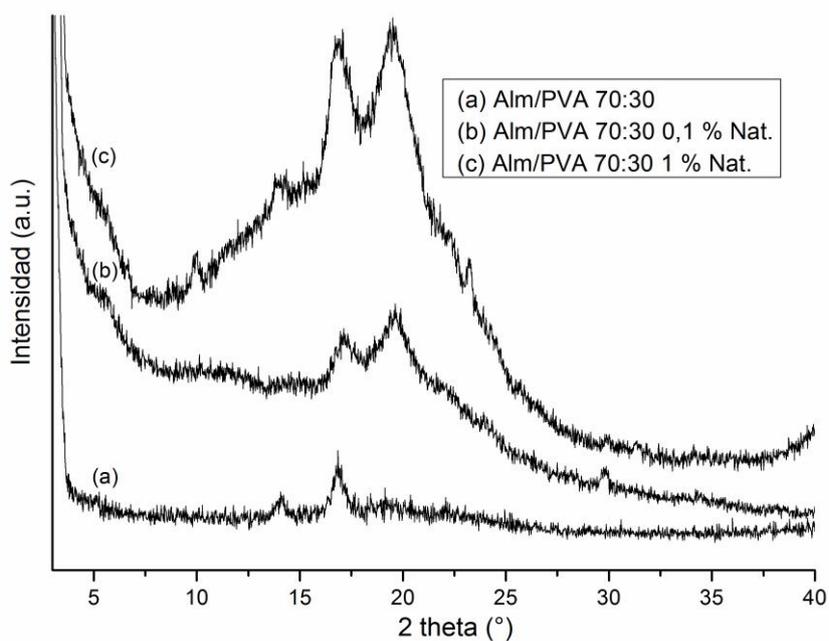
Bierhalz y col. (2013) encontraron que la adición de natamicina como parte de la solución formadora de película de alginato disminuyó la TID en 10 °C, a diferencia de lo que se observa para este caso donde la TID no varió para cada formulación con el agregado de natamicina.

Cuando se reemplazó PVA por PU, el índice  $T_5$  disminuyó, presentando el valor mínimo para las películas Alm/PVA/PU 70:15:15. Los valores de  $T_5$  para las películas con PU están dentro del rango de temperatura de pérdida de agua (60-100 °C), mostrando que por un lado la naturaleza hidrofóbica del PU facilita la pérdida de agua en las muestras pero que, por otro lado, la naturaleza anfifílica de la natamicina produce algunas variaciones en estos valores. Cuando hay natamicina presente en la formulación, se observó que la  $T_5$  disminuyó, modificando el comportamiento de la estructura polimérica.

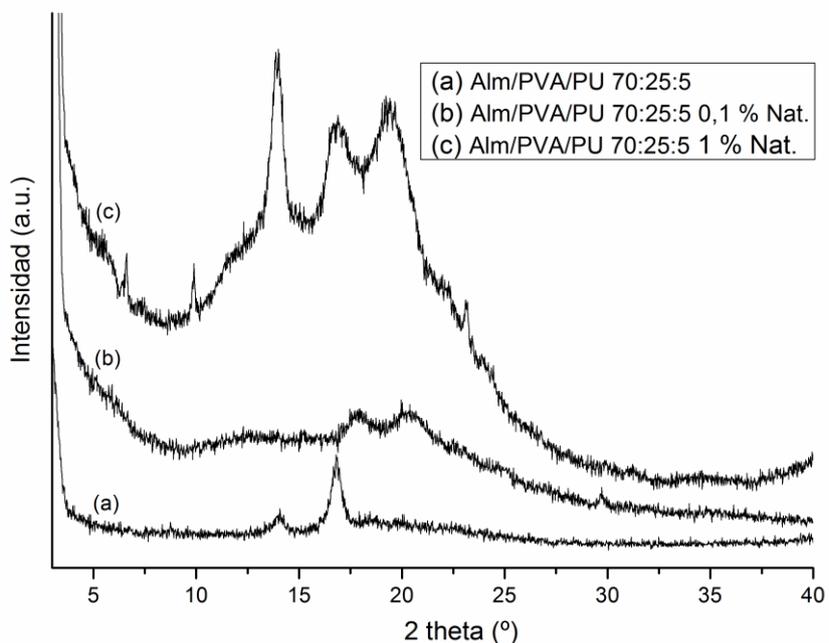
Para el índice térmico  $T_{50}$  se observó nuevamente un comportamiento diferencial para la mezcla Alm/PVA/PU 70:20:10 con natamicina, pero en este caso mostró un aumento de la estabilidad a diferencia de lo que ocurría sin natamicina. Para las tres mezclas con PU en presencia de natamicina los valores de  $T_5$  y  $T_{50}$  son estadísticamente iguales; pero en ambos casos hay una diferencia estadística con respecto a las películas sin PU.

#### 3.8.3.2.6. Análisis de difracción de rayos-X

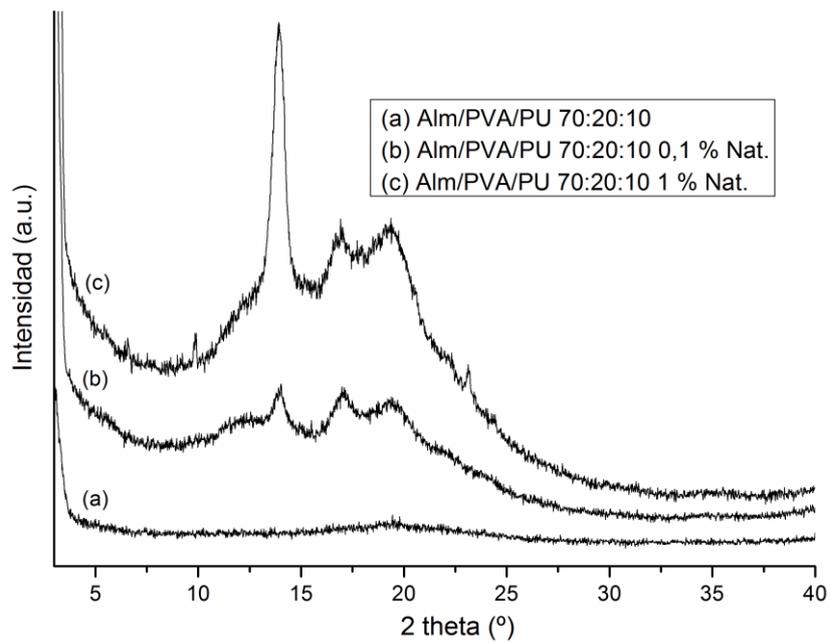
A través del estudio de los diagramas de difracción de rayos-X se estudió la estructura de las películas. Para este estudio se compararon los diagramas de difracción de rayos-X de películas base y películas con 0,1% y 1% p/p de natamicina, con el objetivo de entender cómo la natamicina interactúa con los componentes de las películas. En las Figuras 3.34 a 3.37 se muestran los espectros de película base y películas aditivadas al 0,1 y 1 % para cada formulación de Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15.



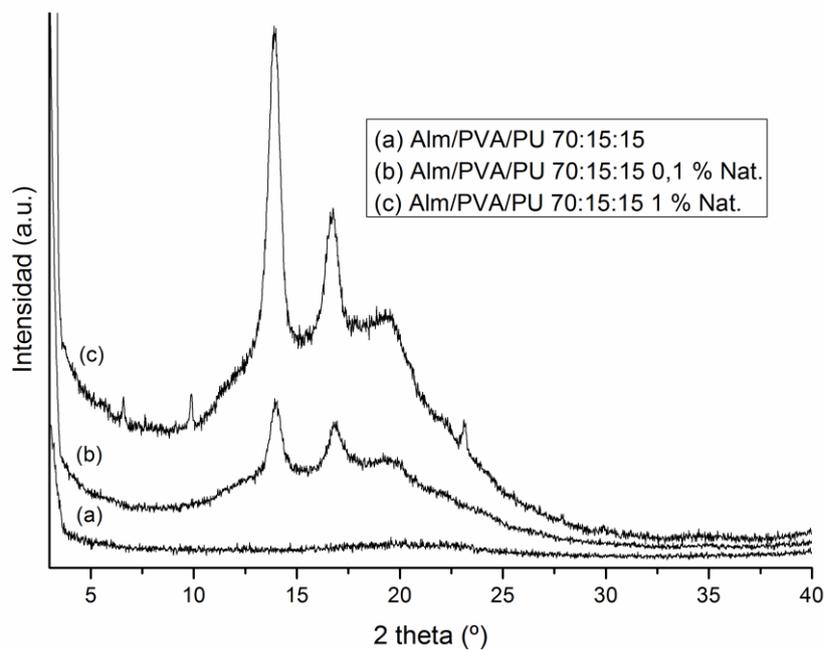
**Figura 3.34.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:30 y 70:30 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.



**Figura 3.35.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:25:5 y 70:25:5 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.



**Figura 3.36.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:20:10 y 70:20:10 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.



**Figura 3.37.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:15:15 y 70:15:15 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.

En todos los casos se observa que al adicionar natamicina a la película, la estructura interna se ve modificada, pudiendo detectarse señales correspondientes a la forma cristalina del almidón. A mayor cantidad de natamicina, mayor intensidad de las señales, y, en algunos casos, presencia de nuevas señales. El máximo a  $20^\circ$ , aparece con notoriedad para las películas Alm/PVA 70:30, y conforme se reemplaza PVA por PU disminuye su intensidad. Esta señal corresponde al complejo amilosa-lípido, y suele ser más notorio en almidones de cereales, como el maíz (Casarrubias-Castillo y col., 2012).

La señal con un máximo a  $14,8^\circ$  se vio maximizada con mayores cantidades de PU, a diferencia de lo que se encontró al estudiar el comportamiento cristalino de las películas de base.

La señal a  $17^\circ$  se puede observar en las películas conteniendo tanto 0,1 como 1 % de natamicina, y sólo se observa con mayor intensidad cuando está presente al 1 % de natamicina para las películas Alm/PVA/PU 70:15:15.

Por otra parte, se hizo evidente que conforme se reemplaza PU por PVA se presenta un diagrama de difracción con menos ruido, lo cual estaría indicando la presencia de una estructura menos amorfa (Frost y col., 2009).

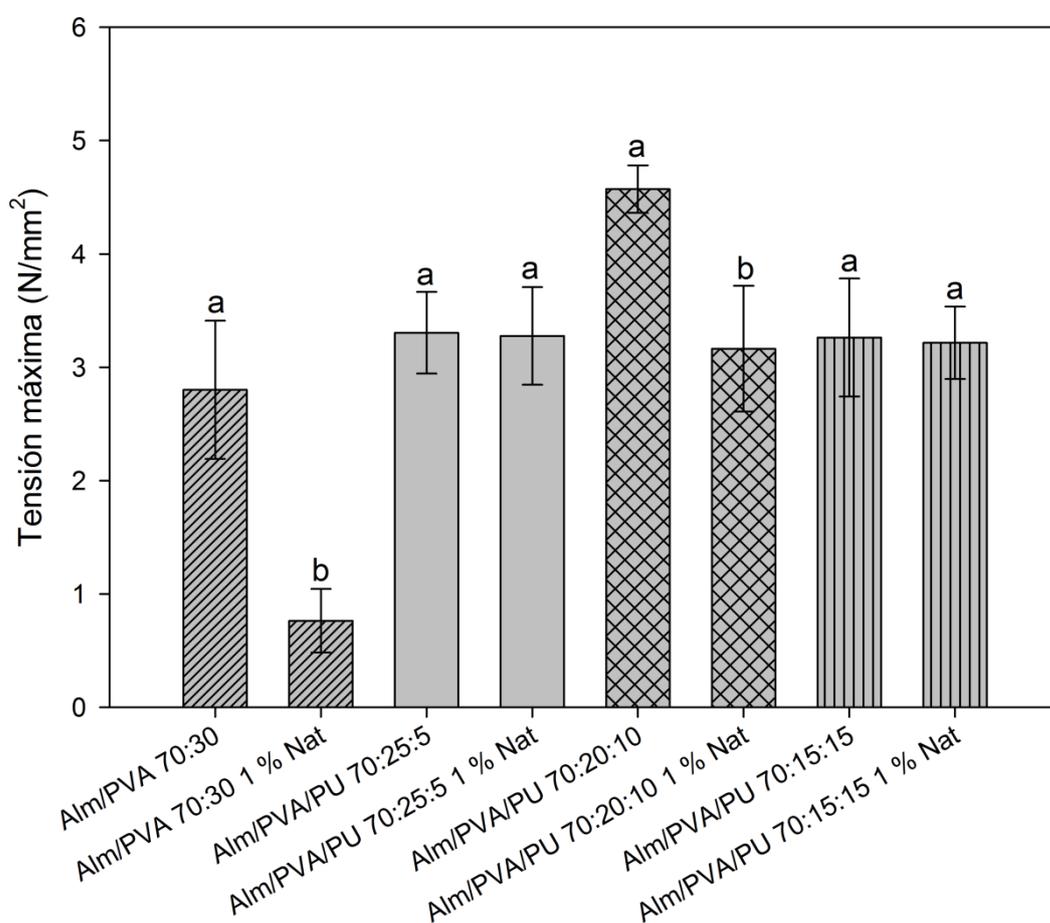
#### 3.8.3.2.7. Propiedades mecánicas

Debido a cuestiones de disponibilidad de los equipos de DMA y texturómetro para realizar los ensayos con las diferentes técnicas, para el análisis de las propiedades mecánicas de las películas aditivadas se presentan únicamente resultados del estudio empleando texturómetro.

##### 3.8.3.2.7.1. Con texturómetro

Al igual que se hizo en secciones anteriores para los resultados de esta técnica, la estadística en todos los casos se presenta por patrón de sombreado. En la Figura 3.38 se presentan los resultados de tensión máxima de ruptura para películas conteniendo natamicina al 1 % y películas de base. En este caso nuevamente se observa una gran dispersión en los resultados, pero de todas formas se puede apreciar una gran caída del valor para las películas Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:20:10 al agregar natamicina, seguramente porque la natamicina está perturbando las interacciones entre los componentes, reduciendo la energía de cohesión y perjudicando por lo tanto la resistencia mecánica. La

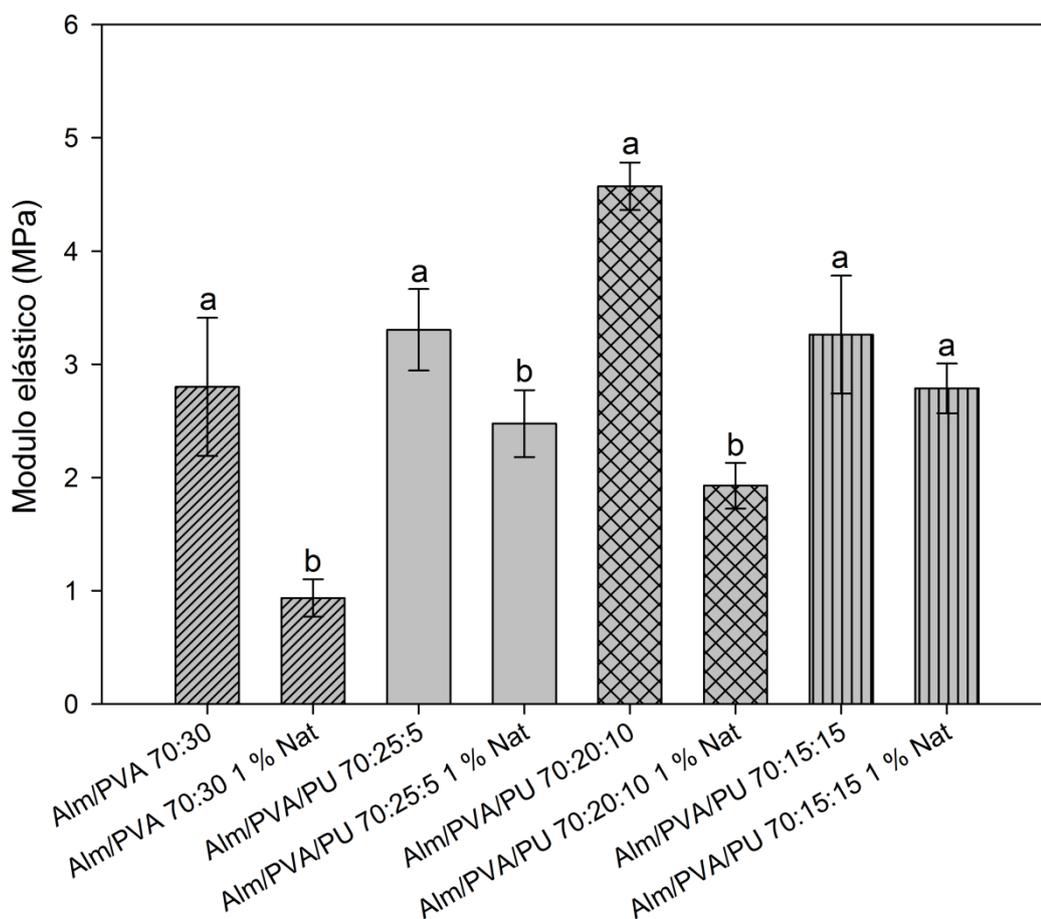
reducción de tensión máxima puede ser atribuida a una modificación en la estructura polimérica por la incorporación de agentes antimicrobianos (Bierhalz y col., 2012). Varios autores han reportado una disminución de la tensión máxima al incorporar un agente antimicrobiano a películas de biopolímeros: dos Santos Pires y col. (2008) analizaron películas de celulosa con natamicina, Cha y Chinnan (2004) estudiaron la incorporación de nisina a películas de alginato y Pranoto y col. (2005), evaluaron los efectos del sorbato de potasio y la nisina sobre las propiedades mecánicas de películas de quitosano.



**Figura 3.38.** Tensión máxima de ruptura (N/mm<sup>2</sup>) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

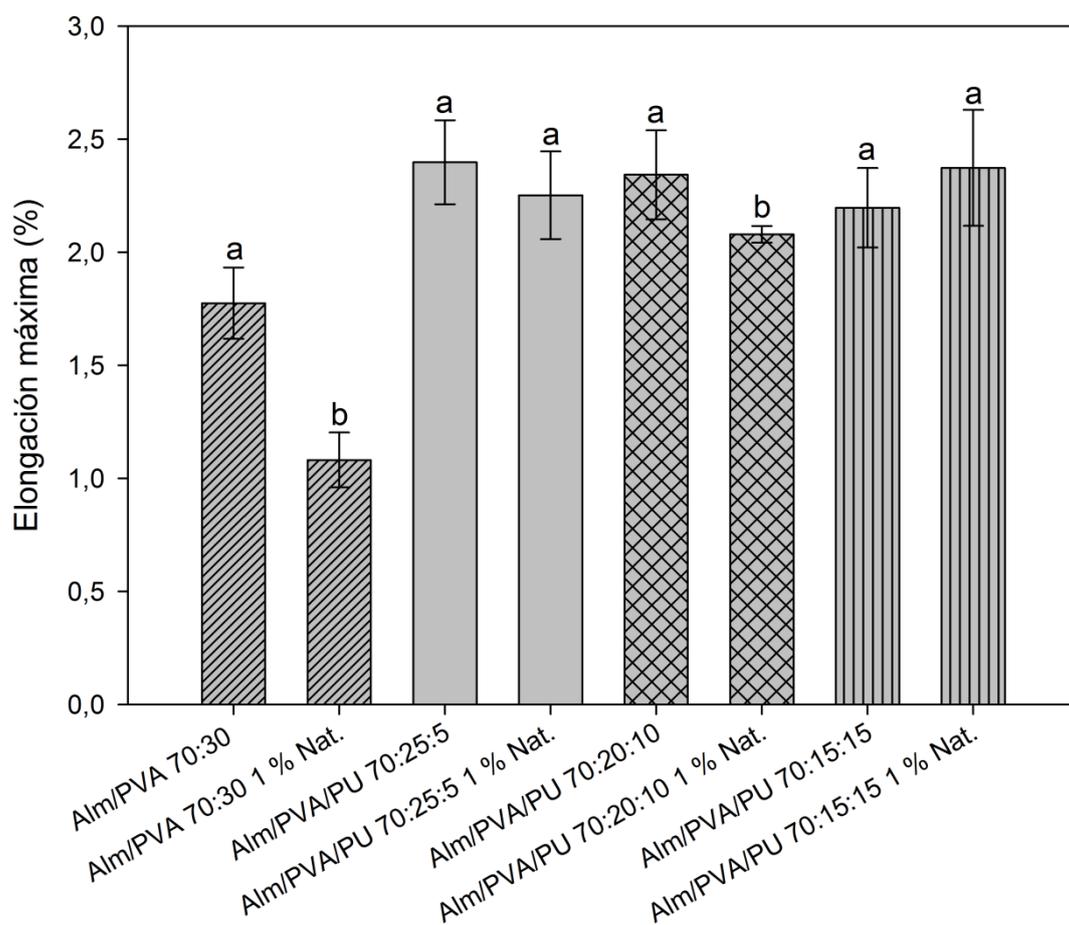
Los resultados para el módulo elástico se pueden observar en la Figura 3.39. Para las formulaciones Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:20:10 existe una

caída importante del valor de módulo elástico, al igual que se observó con la tensión máxima. Las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 presentan también una caída estadísticamente significativa del módulo elástico, pero en menor medida que las anteriores. Por último, las películas Alm/PVA/PU 70:15:15 no muestran una diferencia significativa del valor del módulo.



**Figura 3.39.** Módulo elástico (MPa) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

En la Figura 3.40 se presentan los resultados de elongación máxima de ruptura porcentual obtenidos para las películas conteniendo natamicina comparadas con las películas de base.



**Figura 3.40.** Elongación máxima de ruptura (%) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Los resultados de elongación máxima presentan la misma tendencia que los de tensión máxima, con valores significativamente menores para las formulaciones Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:20:10 y sin cambios para las demás. En una recopilación de trabajos de películas aditivadas con antimicrobianos, reportaron que es esperable encontrar cambios considerables en las propiedades mecánicas ya que la adición de estos aditivos lleva a la modificación de las características físicas (Bastarrachea y col., 2011). La pérdida de integridad mecánica podría ser causada por un exceso de agente antimicrobiano que no haya sido incorporado debidamente al polímero (Han, 2000).

### 3.8.3.2.8. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

En la Tabla 3.12 a continuación se presentan los valores de WVP obtenidos para películas con y sin natamicina al 1 % p/p. En todos los casos la comparación estadística se realizó por pares con y sin natamicina, no encontrado diferencias significativas en ningún caso ( $\alpha=0,05$ ).

**Tabla 3.12.** Permeabilidad al vapor de agua de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %.

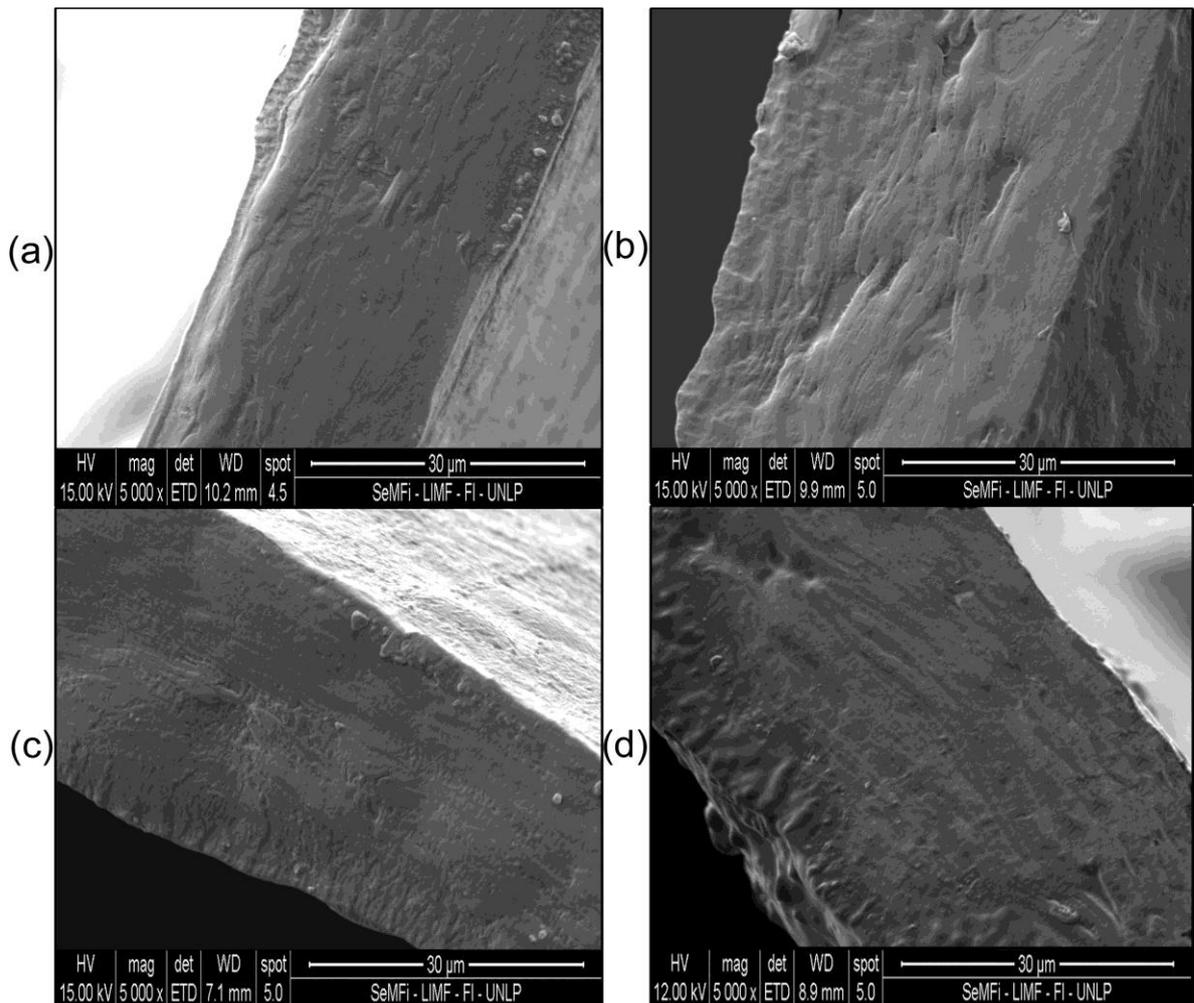
<b>WVP x 10<sup>-11</sup> (g.s<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sin natamicina</b>	<b>Con natamicina 1 %</b>
Alm/PVA 70:30	0,065 <sup>a</sup>	0,069 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5	0,089 <sup>a</sup>	0,076 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:20:10	0,081 <sup>a</sup>	0,062 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15	0,103 <sup>a</sup>	0,094 <sup>a</sup>

Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Varios autores encontraron que el agregado de natamicina a películas de biopolímeros como alginato o pectina incrementaba significativamente la permeabilidad al vapor de agua (Pranoto y col., 2005; Bierhalz y col., 2012), argumentando que en este tipo de películas, el pobre empaquetamiento de las moléculas en la película cargada con natamicina aumentó el volumen libre de la estructura polimérica causando un aumento de permeabilidad. En algunos trabajos también se presentan valores similares de WVP en presencia y ausencia de natamicina como aditivo (Fajardo y col., 2010; da Silva y col., 2011). La diversidad de los resultados refuerza el concepto de que la WVP depende fuertemente de la composición de la película.

### 3.8.3.2.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

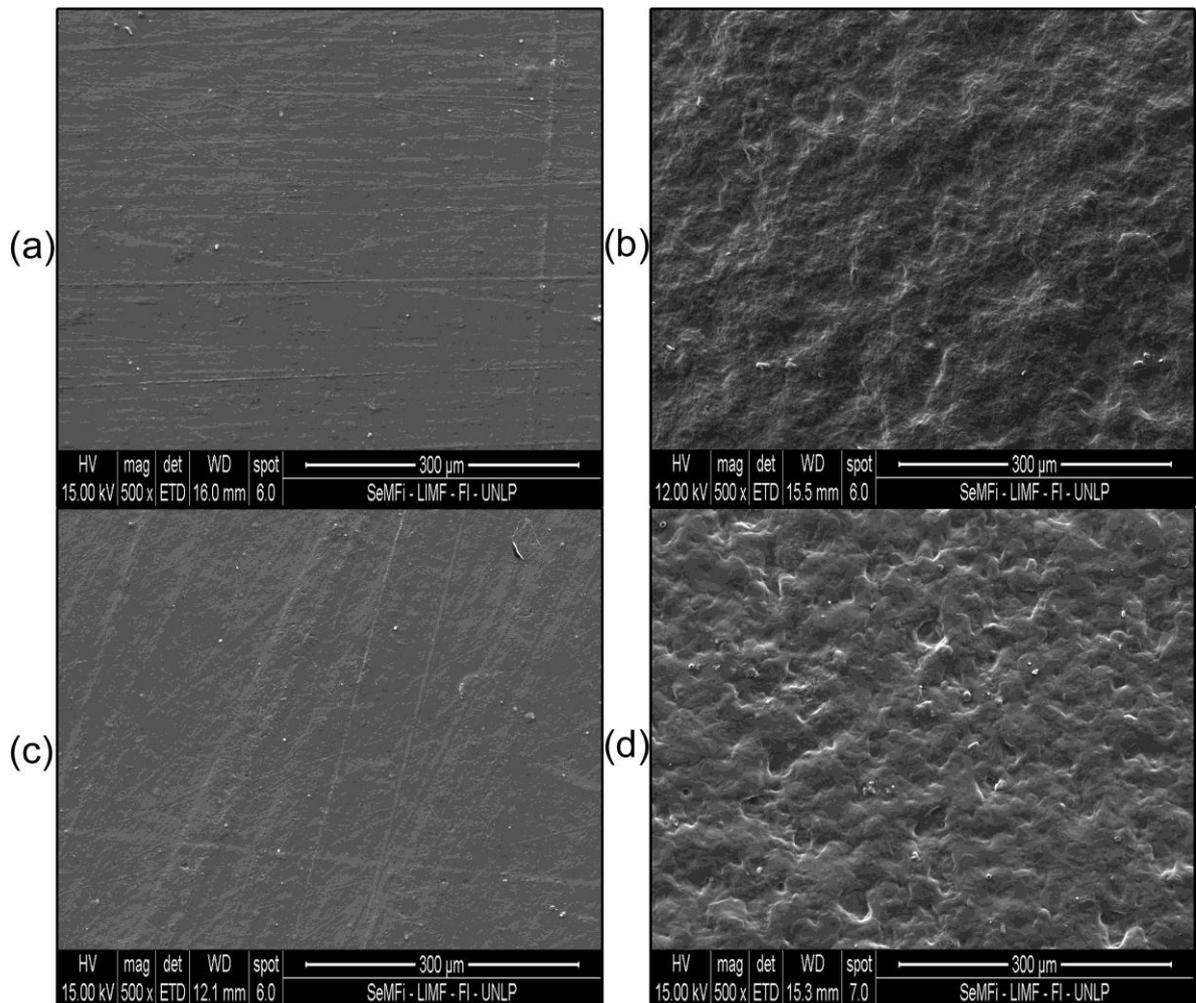
Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de secciones de criofractura y de superficie de las películas cargadas con natamicina se muestran en las Figuras 3.41 y 3.42.



**Figura 3.41.** Imágenes SEM (5000x) de cortes transversales de películas de (a) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina, (b) Alm/PVA/PU 70:25:5 con 1 % natamicina, (c) Alm/PVA/PU 70:20:10 con 1 % natamicina y (d) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina. Escala: 30 µm.

Se observan superficies lisas y sin huecos para todos los casos, sin evidencia de separación de fases, mostrando que la incorporación de natamicina al 1 % p/p no modificó la buena compatibilidad que existía previamente entre los componentes de las formulaciones. No se observan cristales de natamicina en la superficie, lo cual indica que la natamicina se incorporó completamente a la dispersión polimérica.

La Figura 3.42 muestra las micrografías de la superficie de ambas caras de películas Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina y Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina.



**Figura 3.42.** Imágenes de SEM de superficie de películas de (a) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina cara sustrato, (b) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina cara aire, (c) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina cara sustrato y (d) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina cara aire. Escala: 300 µm.

En las imágenes de las superficies de ambas caras de las películas se puede observar que la cara sustrato presenta una superficie lisa, que toma el patrón del material sobre el que estaba apoyado. En el caso de la cara aire se observa una superficie irregular, con poros, pero sin presencia de cristales.

Algunos autores encontraron al analizar películas de almidón, celulosa, metilcelulosa y alginato/quitosano conteniendo natamicina por SEM la presencia de cristales de natamicina en los cortes y en las superficies, dada la baja solubilidad de la natamicina (dos Santos Pires y col., 2008; Türe y col., 2009; da Silva y col., 2011). En este trabajo se encontró una buena compatibilidad de la natamicina con los componentes de la película al estudiarlas con esta técnica.

### 3.9. Conclusiones parciales

- Se obtuvieron películas compuestas por almidón en un 70 % y un 30 % de mezclas de PVA y PU. Las películas compuestas presentaron mejoras en sus propiedades mecánicas, ya que los componentes interactúan entre sí a través de enlaces puente de hidrógeno, permitiendo buena miscibilidad entre ellos y contribuyendo a la energía de cohesión.
- Los espectros FTIR evidenciaron que la interacción ocurre entre las cadenas del PU y los grupos –OH del almidón y del PVA.
- La incorporación de PU en las formulaciones, además, provocó una mejora en las propiedades de barrera ya que redujo el contenido de agua residual, el grado de hinchamiento y la permeabilidad al vapor de agua por sus características hidrofóbicas.
- Cuando se adicionaron antioxidantes a las películas, se obtuvieron buenas películas con 1 % de  $\alpha$ -tocoferol y con 3 y 5 % de BHT. Cantidades mayores a 1 % de  $\alpha$ -tocoferol llevaron a una separación de fases del aditivo.
- El agregado de BHT produjo cambios en las propiedades mecánicas del material, pero éstos no fueron muy importantes. Por el contrario, con  $\alpha$ -tocoferol los cambios fueron significativamente mayores.
- Al adicionar natamicina a las películas se encontró, con las técnicas espectroscópicas (FTIR, UV), que existen interacciones específicas entre los componentes de base de las películas y la natamicina.
- La estructura interna de las películas se vio modificada por el agregado de natamicina, pudiendo detectarse señales de difracción de rayos-X correspondientes a la forma cristalina del almidón. Con la adición de natamicina al 0,1 % los cambios no fueron tan evidentes, comparado con lo observado con 1 %.
- Las imágenes por SEM de cortes transversales de películas aditivadas con natamicina 1 % evidenciaron que no se modificó la buena compatibilidad que existía previamente entre los componentes de las formulaciones.
- Las variaciones en las características y propiedades de películas con natamicina al 1 % son mínimas, lo que permite concluir que las formulaciones aditivadas con diez veces menos de natamicina (0,1 %) conforman un potencial recubrimiento activo sin sacrificar las propiedades de las películas sin aditivar.

## **4. ENSAYOS EN SISTEMAS SIMULADOS Y REALES. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS**

### **4.1. Introducción**

#### **4.1.1. Migración en alimentos**

Todos los envases o recubrimientos plásticos, además del polímero “base”, contienen un número de otras sustancias agregadas deliberadamente durante la manufactura y procesamiento del mismo o bien de manera no-intencional en forma de residuos provenientes del proceso de polimerización. El propio polímero, al ser de alto peso molecular, inerte y con solubilidad limitada en sistemas acuosos o grasos, es difícil que se transfiera al alimento en una cantidad significativa. El interés de la “seguridad en el uso de envases/recubrimientos plásticos” radica principalmente en la posible toxicidad de otros constituyentes de bajo peso molecular presentes en el material final y que pueden migrar al producto alimenticio durante el almacenamiento.

Como se dijo anteriormente estos compuestos no deseados pueden provenir de dos fuentes:

- 1) *Residuos de la polimerización*, incluyendo monómeros, oligómeros, catalizadores, solventes, emulsificantes y agentes de mojado, impurezas, inhibidores y productos de descomposición o de reacciones laterales.
- 2) *Aditivos del proceso*, tales como antioxidantes, agentes antibloqueo, agentes antiestáticos, estabilizadores térmicos y UV, plastificantes, lubricantes, pigmentos, cargas, fungicidas, entre otros.

Estos pueden ser agregados para facilitar el proceso o para mejorar las propiedades y estabilidad del producto final, y pueden estar presentes en cantidades variables, desde unas pocas partes por millón hasta porcentajes cercanos a la unidad. Desde el momento en que los compuestos del primer grupo son introducidos inadvertidamente, la única forma de reducir su contenido es mediante la optimización del proceso de polimerización.

La migración de aditivos desde los materiales de envase en contacto con alimentos hacia el producto alimenticio, ha tomado mucha importancia desde principios de los 80's. Este creciente interés ha sido atribuido a la demostración

del efecto carcinogénico en roedores y los potenciales efectos estrogénicos en humanos, revelados por varios estudios toxicológicos sobre plastificantes de uso común en la industria del envase o recubrimiento. Esta incidencia indica que el material mismo puede representar una fuente de contaminación a través de la migración de diferentes sustancias hacia el alimento. Así, las autoridades regulatorias alrededor del mundo han reconocido que es necesario controlar estos aspectos, y existe en muchos países una legislación extensa y en constante actualización sobre estos temas (Lau y Wong, 2000).

Los procesos de migración dependen de varios factores. Además de la temperatura y del tamaño molecular de la especie que migra (migrante), la estructura química y polaridad de cada compuesto condicionan su difusión a través de la masa polimérica, razón por la cual moléculas diferentes (plastificantes y antioxidantes por ejemplo) se comportan de forma muy distinta en el mismo material, y por tanto, presentan migraciones muy diferentes. También la naturaleza del polímero en el que difunden (grado de cristalinidad, densidad, etc.) influye en el proceso de migración. En consecuencia, no puede establecerse un patrón general que permita evaluar la migración específica en todas las moléculas y en todos los polímeros existentes (Nerin, 2002).

Katan (1996) ha definido la migración como “la transferencia de masa de una fuente externa al producto envasado mediante un proceso submicroscópico”. Las consecuencias básicas de dicha migración son, básicamente:

- en el envase o recubrimiento, alteración de las propiedades físico-químicas y mecánicas del material por pérdida de componentes presentes inicialmente en el mismo.
- en el producto, cambios en la composición, por la incorporación de sustancias “migrantes” que pueden afectar sensiblemente sus características sensoriales modificando su calidad y aceptación comercial, o que, en algunos casos, son de carácter tóxico para el organismo humano, limitando su aptitud para el consumo.

El primer aspecto puede tener algún interés tecnológico por afectar la estabilidad del envase, pero no tiene incidencia en la calidad y salubridad del alimento envasado, como sí puede tener la incorporación al mismo de componentes del material por migración (Catalá y Gavara, 2002).

#### 4.1.2. Cuantificación de la migración

En principio, la migración o, expresado de una manera más rigurosa, la extractabilidad de un compuesto de una matriz polimérica por un alimento, puede ser determinado poniendo en contacto el polímero (de superficie conocida) con el producto alimenticio bajo condiciones conocidas de temperatura y tiempo. Luego utilizando una técnica analítica apropiada se cuantifica el compuesto de interés presente en el alimento y, de esta manera calcular la migración, la que usualmente se expresa en términos de  $\text{mg}/\text{dm}^2$ . Lamentablemente, en la práctica, esta determinación no es tan sencilla por varias razones (Catalá y Gavara, 2002):

- los compuestos presentes en el material bajo análisis pueden ser desconocidos y/o pueden haber sido degradados durante el procesamiento.
- muchos compuestos son difíciles de determinar analíticamente cuando se encuentran en una matriz tan compleja como un alimento, en particular cuando se encuentran en concentraciones muy bajas.
- se pueden extraer, junto con el compuesto de interés, otros migrantes o compuestos del alimento, que interfieran y/o dificulten la cuantificación.
- la mayoría de los alimentos son estables solo por un corto período de tiempo, mientras que los datos de extractabilidad requieren estudios extensos en el tiempo.
- las condiciones de ensayo no son fáciles de definir, ya que las condiciones de contacto en la práctica varían mucho de acuerdo a la cadena de distribución del producto, cadena de frío, etc.

Es por estas razones que existen los denominados *simulantes alimenticios* y condiciones de ensayo específicas para emular las condiciones de almacenamiento que más favorezcan la migración hacia el alimento de un determinado producto.

#### 4.1.3. Clasificación de alimentos, simulantes y condiciones de ensayo

El Código Alimentario Argentino (CAA, 2014b) establece la clasificación de los alimentos y la asignación de simulantes, para realizar los ensayos de migración sobre los mismos. Desde el punto de vista de la interacción con los envases y equipamientos plásticos, los alimentos se clasifican del siguiente modo:

- acuosos no ácidos ( $\text{pH} > 4.5$ )
- acuosos ácidos ( $\text{pH} < 4.5$ )

- grasos (que contienen grasas o aceites entre sus componentes)
- alcohólicos (contenido de alcohol  $\geq$  5% (v/v))
- secos

En el CAA se definen los siguientes simulantes para los ensayos de migración de envases y equipamientos plásticos en contacto con alimentos:

- *Simulante A*: agua destilada o desionizada.
- *Simulante B*: solución de ácido acético al 3% (m/v) en agua destilada o desionizada.
- *Simulante C*: solución de etanol al 10% (v/v) en agua destilada o desionizada, concentración que se ajustará al contenido real de etanol del producto en el caso de que el mismo supere el 10% (v/v).
- *Simulante D*: solución de etanol al 95% (v/v) en agua destilada o desionizada, o isooctano, o MPPO (óxido de polifenileno modificado), según corresponda;
- *Simulante D'* (simulante equivalente al simulante D): aceites comestibles (aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz) o mezclas sintéticas de triglicéridos.

En el caso de utilizarse simulantes de alimentos grasos en los ensayos de migración, según el CAA corresponderán los siguientes: para los ensayos de migración total, simulante D (el que corresponda), o simulante D'; para los ensayos de migración específica, simulante D (el que corresponda), o simulante D'; para los ensayos de migración de sustancias que confieren color en materiales, envases y equipamientos plásticos que contengan colorantes en su formulación, aceite de coco.

Según el tipo de alimento, los simulantes con los que se deberán realizar los ensayos de migración son los siguientes:

**Tabla 4.1:** Tipo de alimento y simulante adecuado para los ensayos de migración.

<b>Alimento</b>	<b>Simulante</b>
Sólo alimentos acuosos no ácidos	A
Sólo alimentos acuosos ácidos	B
Sólo alimentos alcohólicos	C
Sólo alimentos grasos	D o D'
Alimentos acuosos no ácidos y alcohólicos	C
Alimentos acuosos ácidos y alcohólicos	B y C
Alimentos acuosos no ácidos conteniendo grasas y aceites	A y D o D'
Alimentos acuosos ácidos conteniendo grasas y aceites	B y D o D'
Alimentos acuosos no ácidos, alcohólicos y grasos	C y D o D'
Alimentos acuosos ácidos, alcohólicos y grasos	B, C y D o D'
Alimentos secos no grasos	No es necesario realizar el ensayo
Alimentos secos grasos	D o D'

En los ensayos de migración se debe realizar el contacto de los materiales plásticos con el simulante, en las condiciones de tiempo y temperatura seleccionados de modo de reproducir lo más fielmente posible las condiciones normales o previsibles de elaboración, fraccionamiento, almacenamiento, distribución, comercialización y consumo del alimento (CAA, 2014b).

Particularmente dentro de los simulantes grasos, el isooctano está recomendado para el caso de polímeros polares, el etanol (95%) para aquellos no-polares y el MPPO para contacto a altas temperaturas. Por otro lado, según el tipo de alimento a envasar, se establecen para los simulantes D o D' los llamados "factores de reducción", usado convencionalmente para tener en cuenta la mayor capacidad extractiva del simulante D o D' respecto de la capacidad extractiva del alimento en cuestión. Si el alimento a evaluar es un queso, el CAA recomienda que se utilice un factor de reducción de 3.

## 4.2 Objetivos

En este capítulo los objetivos fueron:

- evaluar la efectividad de las películas aditivadas con antioxidantes en un sistema simulado.
- estudiar mediante ensayos microbiológicos la efectividad de los antifúngicos elegidos frente a cepas de interés.
- evaluar en el laboratorio la efectividad de las películas aditivadas antimicrobianas frente a cepas de interés.
- determinar la efectividad de los recubrimientos funcionales sobre un alimento testigo de alto contenido graso.

## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1. Materiales

Se utilizaron los mismos materiales que se describieron en el capítulo anterior. El isooctano fue de grado p. a. (Anedra), y el queso utilizado fue un semiduro tipo Tybo marca Cayelac. Los agares Papa glucosado, Mueller Hinton y Sabouraud glucosado utilizados fueron marca Brittonia. Se utilizó natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid Salt y Delvo<sup>®</sup>Cid XT1, donadas gentilmente por Miguel Lombardo de Grupo Harmony, División “Food Specialties”.

### 4.3.2. Ensayos en películas

#### 4.3.2.1. Absorción de isooctano

Como se explicó anteriormente, el isooctano (2,2,4-trimetilpentano) es un disolvente homologado por el CAA para su utilización como simulante graso.

Previo a los ensayos de migración, se estudió la capacidad de absorción de isooctano de las películas base sin aditivos en frascos herméticos sumergiéndolas en un volumen fijo del solvente (20 mL) a 25 °C y se hicieron pesadas diarias hasta las 72 horas. El ensayo se realizó por duplicado.

#### 4.3.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de películas activas

Mediante el seguimiento de bandas de absorción características en el espectro IR de un “alimento testigo”, se evaluó el efecto antioxidante de las

películas activas. Para este ensayo se utilizó aceite de oliva extra virgen (corresponde a simulante D' según el CAA). Se colocaron 10 ml de aceite de oliva extra virgen comercial "Nucete" en frascos de vidrio y se sumergió en los mismos una película de 4,5 cm de diámetro y aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de espesor con las diferentes concentraciones de BHT o  $\alpha$ -tocoferol. La estabilidad oxidativa fue ensayada a 60° C para llevar a cabo un proceso acelerado, evaluando también una muestra sin aditivar a modo de control. También se prepararon 3 frascos conteniendo aceite y la cantidad correspondiente a los porcentajes de antioxidantes contenidos en la película puros para evaluar el efecto máximo posible de los mismos en contacto con el medio. A intervalos determinados de tiempo, y previa agitación, se tomaron muestras de cada frasco y se obtuvieron los espectros FT-IR con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) de ZnSe del equipo Nicolet 380 (EEUU). Los espectros vibracionales fueron comparados entre ellos y con el de la muestra control a tiempo cero. Se estudió la relación de dos bandas, una constante en el tiempo y una variable para llevar a cabo el seguimiento de la oxidación del aceite. Las muestras se prepararon por duplicado.

#### 4.3.2.3. Estudio de la distribución de natamicina en ambas caras de la película

Mediante FT-IR con accesorio ATR se determinó la concentración de natamicina en ambos lados (aire y sustrato) de películas conteniendo natamicina al 1 % para evaluar si la distribución de ésta era homogénea o no. Para esto se compararon los espectros de cada lado de la película, observando particularmente el pico a 1715  $\text{cm}^{-1}$  característico del éster conjugado de natamicina. Se trabajó con espectros de absorbancia, aplicando corrección de línea de base y reducción de ruido.

#### 4.3.3. Aplicación de recubrimientos activos sobre quesos

Para los ensayos con un sistema testigo se eligió un queso semiduro Tybo comercial tipo barra marca "Cayelac" (Figura 4.1) (Cayelac, 2016). La elección de este tipo de queso se hizo teniendo en cuenta que es un queso con un grado de humedad distribuido homogéneamente en toda su masa (Bertola, 1982), que no se modificaba considerablemente con el tiempo, y que, por lo tanto, permitió realizar los ensayos con trozos obtenidos a partir de la barra.



**Figura 4.1.** Características del Queso Tybo marca Cayelac, empleado en los ensayos.

#### 4.3.3.1. Espesor de recubrimiento aplicado a queso

La determinación del espesor final de las películas luego de la aplicación por inmersión, también se realizó con queso Tybo Cayelac, cortando cubos pequeños de aproximadamente 3 cm x 3 cm x 1,5 cm. A fin de establecer una clara diferencia entre la película y la superficie del queso se utilizaron 3 colorantes que se incorporaron en forma de solución acuosa concentrada, a saber: negro de eriocromo T, fucsina básica y cristal violeta.

Se prepararon las dispersiones correspondientes a las películas 70:30, 70:25:5 y 70:15:15 de la forma habitual (sección 3.5) pero sin incorporación de agua destilada. A continuación se agregó la solución del colorante concentrado (5 gotas de cada uno a cada mezcla). Luego las dispersiones se concentraron en baño a 70 °C con agitación mecánica hasta eliminar aproximadamente el 28 % de su peso inicial. En estas condiciones las dispersiones presentaron una mayor viscosidad sin grumos, lo cual facilitó el proceso de incorporación por capas sobre el queso.

Se realizaron capas sucesivas por inmersión de los cubos de queso en las dispersiones concentradas. Luego de cada inmersión se dejó escurrir el exceso, y se colocó cada cubo sobre una placa siliconada. La placa se llevó a estufa de convección forzada a 30 °C, y se hicieron volteos de los cubos cada 10-15 minutos para que todas las caras se secaran. Este proceso se repitió hasta lograr cubrir todos los cubos con tres capas.

Posteriormente, se realizó un corte “limpio” a los cubos de queso para poder visualizar la capa de colorante. Por último, se utilizó una lupa con aumento 10X, escala milimetrada y luz directa para fotografiar los límites de color. Para determinar el espesor se utilizó el software Image-Pro Plus.

#### 4.3.3.2. Ensayo de difusión de natamicina

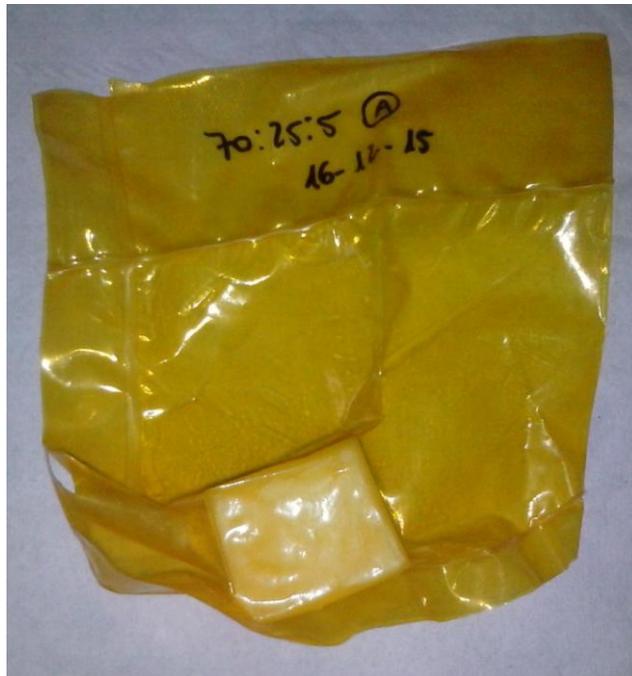
El Código Alimentario Argentino (CAA) establece que la natamicina es un conservante permitido en superficie de quesos de muy alta, alta, mediana y baja humedad, y no debe ser detectable a 2 mm de profundidad desde la “cáscara”, además de estar ausente en la masa (CAA, 2014a; CAA, 2014b).

Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon dispersiones de almidón/PVA/PU en proporciones 70:30, 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15, todas conteniendo 1 % natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1, siguiendo las etapas previamente explicadas en la sección 3.5., con la salvedad de que no se llevó a cabo agregado de agua destilada. Luego del agregado de todos los componentes, incluida la natamicina solubilizada en agua de la misma forma antes expuesta en la sección 3.5.5.2. se procedió a concentrar las mezclas por evaporación a 70 °C en baño con agitación mecánica, hasta lograr una pérdida de aproximadamente 28% p/p. Luego las soluciones se llevaron a temperatura ambiente con agitación magnética en baño de agua. Es necesario aclarar que en todos los pasos que incluían

natamicina se mantuvieron las soluciones o mezclas en la oscuridad ya que la molécula es muy sensible a la luz.

Para esta experiencia se utilizó también queso Tybo marca Cayelac, el cual fue cortado en cubos de 3 cm x 3 cm x 3 cm. Se procedió a sumergir los cubos de queso en las mezclas correspondientes, dejando escurrir el exceso para luego colocarlos sobre una placa siliconada que fue llevada a una estufa de tiro forzado a 30 °C. Cada 15 minutos se realizaron volteos de los cubos para asegurar que todas las caras lograran secarse. Este proceso se llevó a cabo repetidamente hasta cubrir los cubos con 3 capas. Para cada muestra se realizaron triplicados.

Los cubos recubiertos fueron colocados de manera individual en bolsas plásticas para quesos y termoselladas al vacío con un equipo Vacuumed Saver (Food Saver, Tila, Italia), y luego se colocaron en cámara a 10 °C durante 75 días (Figura 4.2). El objetivo fue permitir la difusión de natamicina al interior del queso (si esto ocurriera), durante un período de tiempo equivalente al de la maduración y distribución de un queso semiduro, que oscila entre los 60 y los 90 días, dependiendo del tamaño del queso.



**Figura 4.2.** Fotografía de un cubo de queso recubierto con la formulación Alm/PVA/PU 70:25:5 conteniendo 1 % de natamicina, envasado al vacío.

Para determinar si la natamicina difundió y logró penetrar más de 2 mm de profundidad en la masa del queso, se procedió según la técnica de De Ruig y col. (1987), que se corresponde parcialmente con la norma ISO 9233 (2013b), también utilizada por Vierikova y col. (2015).

En primera instancia se procedió a remover la parte exterior de los cubos de quesos a 2 mm de profundidad, y luego se cortó el remanente en piezas de 0,5 cm<sup>2</sup> y se mezclaron para homogeneizar la masa. Luego se pesaron 5 ± 0,01 g de muestra y se colocaron en un Erlenmeyer de 100 mL. Se agregaron 50 mL de metanol puro (MeOH) y se mantuvo con agitación magnética durante 90 min, para después agregar 25 mL de agua destilada. Para precipitar las grasas, se colocó el Erlenmeyer en freezer a -18 °C, y se dejó durante una hora. Se procedió a filtrar el extracto frío con embudo Buchner y kitasato, utilizando un papel Whatman N° 3, y se descartaron los primeros 5 mL. El extracto se llevó a temperatura ambiente, y luego se filtró empleando una jeringa con filtro de nylon de 0,45 µm. Por último se filtró a través de un filtro de 0,2 µm tipo FG con jeringa de vidrio.

Para la determinación espectrométrica por UV-visible se hicieron medidas entre 200 y 800 nm, utilizando como blanco una solución MeOH:H<sub>2</sub>O en relación 2:1. Se midió la absorbancia del mínimo a 311,5 nm, y de los máximos a 318 y 329 nm, bandas de absorción características de la natamicina.

Para las curvas de calibración correspondientes se utilizó una solución madre de 37,5 ppm de natamicina en MeOH:H<sub>2</sub>O en relación 2:1, y se realizaron diluciones sucesivas.

#### 4.3.4. Ensayos microbiológicos

##### 4.3.4.1. Aislamiento de colonias de *Penicillium spp* de quesos

Se procedió a aislar cepas de *Penicillium spp* a partir de quesos enmohecidos de dos salas de maduración de quesos, una perteneciente a la Cátedra de Agroindustrias de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata; la otra procedente del colegio Agrotécnico Don Bosco Uribelarrea de la provincia de Buenos Aires.

Para esto se procedió a raspar la superficie de los quesos con un hisopo estéril y luego se llevó a cabo el proceso para aislar e identificar las cepas de la siguiente manera (Pitt, 1991):

- 1) Se tomaron muestras con bisturí estéril de la cáscara de quesos.

2) Se sembraron en tubos en pico de flauta con Agar Sabouraud glucosado y cloranfenicol (250 mg/L).

3) Se incubaron a 25-28 °C, durante 10 días.

4) Se repicaron las cepas más representativas a Agar Papa glucosado y Czapek-Dox. A partir de estos cultivos, se realizaron estudios macro y micromorfológicos a través de las características de colonias gigantes y microcultivos.

#### 4.3.4.2. Estudio de sensibilidad de las películas frente a *Penicillium spp.*

Se trabajó con un total de seis películas de diferente composición. Todas las películas fueron inoculadas con una suspensión 0,5 escala de Mc Farland, que es equivalente a  $1,5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc)/mL con *Penicillium spp* 1 y *spp* 2. Posteriormente, las películas fueron incubadas en distintas condiciones de temperatura y humedad, como se detalla a continuación:

- 1) Placas con agar al 2 % sobre el cual se depositaron las películas.
- 2) Placas con un papel embebido en agua destilada estéril dentro de las cuales se colocaron las películas sobre un soporte de vidrio simple y otro doble (geometría tipo “sándwich”).

Por otra parte, las seis películas fueron expuestas en placas durante 1 hora al ambiente (sin inoculación) y luego fueron incubadas a temperatura ambiente, a 28 °C durante 45 días.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

En la Figura 4.3 se pueden observar las placas con soporte de vidrio simple y tipo “sándwich” a tiempo cero conteniendo películas de almidón puro. En el fondo de la placa se observa un papel embebido en agua destilada para otorgar humedad al ambiente. Los números “1” y “2” corresponden a los puntos de inoculación de las cepas.



**Figura 4.3.** Películas de almidón: a la izquierda a tiempo cero sobre soporte de vidrio simple, a la derecha sobre soporte tipo sándwich.

#### 4.3.4.3. Evaluación de la capacidad antimicrobiana (antimicogramas)

En este ensayo se evaluó la capacidad antimicrobiana de la natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid Salt (con 50 % NaCl) en concentraciones 0,1; 0,2 y 0,3% y de sorbato de potasio al 1, 2 y 3 % frente a las distintas cepas aisladas de quesos semiduros de *Penicillium spp.*; y también frente a las cepas de hongos ambientales que crecieron sobre la superficie de las películas incubadas en frío *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus Niger sp.*, *Mucor sp.* y *Cladosporium sp.*

Para realizar los antimicogramas se utilizó agar Müller -Hinton (Comité de la OMS para la normalización de las pruebas de susceptibilidad) y se llevó a cabo el ensayo según el método de Kirby-Bauer:

- 1) Se emplearon placas de 9 cm de diámetro, y se agregaron 15 mL de medio de cultivo por placa.
- 2) Se colocó un inóculo de 0,5 µL de la cepa en concentración 0,5 de la escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^9$  ufc/mL) y se lo esparció en forma homogénea sobre la superficie con un aplicador estéril.
- 3) Con ayuda de un sacabocados se realizaron 3 pocillos en cada caja con agar, en las cuales se colocaron los antimicrobianos en las 3 concentraciones.
- 4) Las placas fueron incubadas cerradas a 25-28 °C durante 96 hs.

#### 4.3.4.4. Evaluación de desempeño antifúngico de películas cargadas con natamicina

Las películas se obtuvieron como se explicó previamente en la sección 3.5. La natamicina utilizada en este caso fue la Delvo<sup>®</sup>Cid XT1 con 50 % de goma xántica.

Se diluyeron colonias de cada una de las tres cepas de *Penicillium spp.*, hasta obtener una concentración equivalente al patrón 0,5 de Mc Farland. La inoculación de las placas de agar Müeller Hinton se realizó adicionando un volumen de 0,5 µL de la solución de cada hongo *Penicillium spp.* a la superficie del agar, para ser distribuida con un aplicador estéril en forma homogénea sobre toda su superficie. Una vez inoculadas las placas de agar, se procedió a depositar en la superficie los discos correspondientes a las muestras y a los controles negativos. El control positivo y el PU se colocaron en forma líquida en pocillos realizados en el agar: la natamicina en solución al 0,1 % y el PU en dilución al 50 %. Las placas se llevaron a incubación a una temperatura de 25-28 °C durante 96 horas. Transcurridas las 96 horas, las placas fueron retiradas de la incubadora y se procedió a realizar las mediciones de los halos de inhibición de los controles y las muestras. Todas las muestras fueron estudiadas por duplicado.

#### 4.3.5. Ensayos de conservación de queso en condiciones de maduración

Para llevar a cabo estos ensayos, se prepararon dispersiones de almidón/PVA/PU en proporciones 70:30, 70:25:5 y 70:15:15, y mezclas 70:30 y 70:25:5 conteniendo 1% de natamicina y 0,1 % de natamicina respectivamente, siguiendo las etapas previamente descritas en la sección 3.5. Luego, al igual que en la sección 4.3.3.1. se procedió a concentrar las mezclas por evaporación a 70 °C en baño con agitación mecánica, hasta lograr una pérdida de peso de aproximadamente 28 % y las soluciones obtenidas se llevaron a temperatura ambiente y se realizó el agregado de la solución de natamicina en los casos correspondientes. En todos los pasos que incluían natamicina se mantuvieron las soluciones o mezclas en la oscuridad.

Para cada una de estas experiencias se utilizó queso Tybo marca Cayelac, el cual fue cortado en trozos de 5 cm x 6 cm x 2 cm. Se procedió a sumergir los cubos de queso en las mezclas correspondientes, de la misma forma que en la

sección 4.3.3.1, hasta cubrir los cubos con 3 capas. Para cada muestra se realizaron duplicados.

Los cubos recubiertos se colocaron en un ambiente controlado con aproximadamente 80 % de humedad relativa con una solución saturada de NaCl y KCl a 10 °C, condiciones correspondientes a la maduración de este tipo de quesos, y se realizó un seguimiento fotográfico diario de la superficie, para evaluar aparición y proliferación de mohos.

El primer ensayo con 1 % de natamicina se llevó a cabo con el objetivo de evaluar si existía un efecto significativo al adicionar natamicina a las formulaciones en el desarrollo de hongos superficiales en las muestras, para luego avanzar a ensayar con la cantidad acorde a las exigencias del CAA.

#### **4.4. Análisis estadístico**

En los casos correspondientes, los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANAVA) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar. Las medias fueron comparadas por el Test de Tukey con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , utilizando el programa InfoSTAT.

#### **4.5 Resultados y Discusión**

##### 4.5.1. Ensayos en películas

##### 4.5.1.1. Absorción de isooctano

Se llevó a cabo un seguimiento del peso de las películas de Alm/PVA/PU en sus tres formulaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15. En la Tabla 4.2 a continuación se detalla el seguimiento de las películas.

**Tabla 4.2.** Evolución del peso de las películas de Alm/PVA/PU sumergidas en isooctano a lo largo del tiempo.

	<b>Peso de la película (g)</b>			
	<b>0 hs</b>	<b>24 hs</b>	<b>48 hs</b>	<b>72 hs</b>
<b>Alm/PVA/PU 70:25:5</b>	0,0117 <sup>a</sup>	0,0118 <sup>a</sup>	0,0117 <sup>a</sup>	0,0117 <sup>a</sup>
<b>Alm/PVA/PU 70:20:10</b>	0,0125 <sup>a</sup>	0,0125 <sup>a</sup>	0,0127 <sup>a</sup>	0,0128 <sup>a</sup>
<b>Alm/PVA/PU 70:15:15</b>	0,0121 <sup>a</sup>	0,0122 <sup>a</sup>	0,0122 <sup>a</sup>	0,0123 <sup>a</sup>

Letras iguales indican medias iguales en la misma fila (Test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

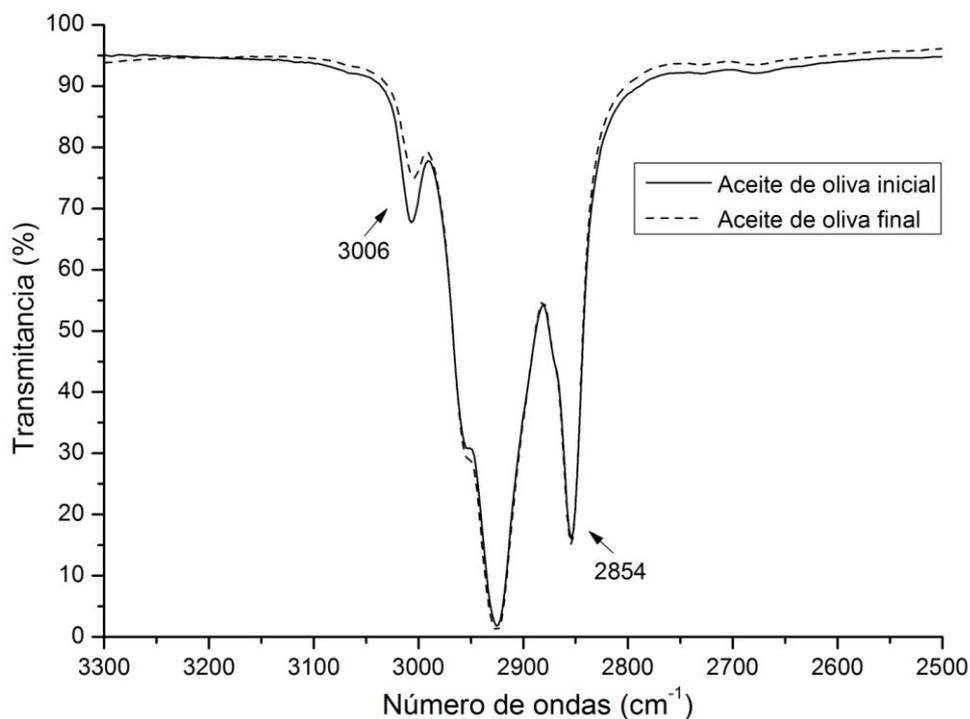
Luego de 72 hs a 25 °C las películas estaban íntegras, sin aumento de peso y por lo tanto no absorbieron isooctano, lo que demuestra que el isooctano es un simulante graso adecuado para evaluar el desempeño de las películas en ensayos de liberación de principios activos.

#### 4.5.1.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de películas activas

El aceite de oliva extra virgen es una mezcla compleja compuesta en un 98 % de triglicéridos, y en un 2 % por sustancias insaponificables. Esta materia insaponificable está compuesta por escualeno (aproximadamente 50 %), esteroides (1000-2000 mg/kg), alcoholes terpénicos y alifáticos, metilesteroides, tocoferoles y compuestos volátiles que aportan al aroma y al sabor (más de 150). El ácido graso mayoritario (entre 53 y 80 %) es el ácido oleico monoinsaturado con 18 átomos de carbono (Navarra y col., 2011).

En este ensayo, para estudiar si las películas activas podrían ejercer un efecto antioxidante, se trabajó con la relación de intensidades de máximos de absorción (absorbancia) a 3006  $\text{cm}^{-1}$  y 2854  $\text{cm}^{-1}$  del espectro infrarrojo. Según Rohman y Che Man (2013), durante una oxidación acelerada de aceite de maíz a 160 °C, la señal a 3008  $\text{cm}^{-1}$  decrece en función del tiempo debido a la disminución de enlaces *cis* alílicos (C=CH). Por otro lado, estos autores remarcan que los picos a 2923 y 2854  $\text{cm}^{-1}$  resultaron inalterados durante el proceso; es por esto que se eligió el máximo a 2854  $\text{cm}^{-1}$  en este ensayo como pico de referencia para calcular la relación entre absorbancias. Van de Voort y col. (1994) reportaron que la señal a 3011  $\text{cm}^{-1}$  (también asignada a la vibración de

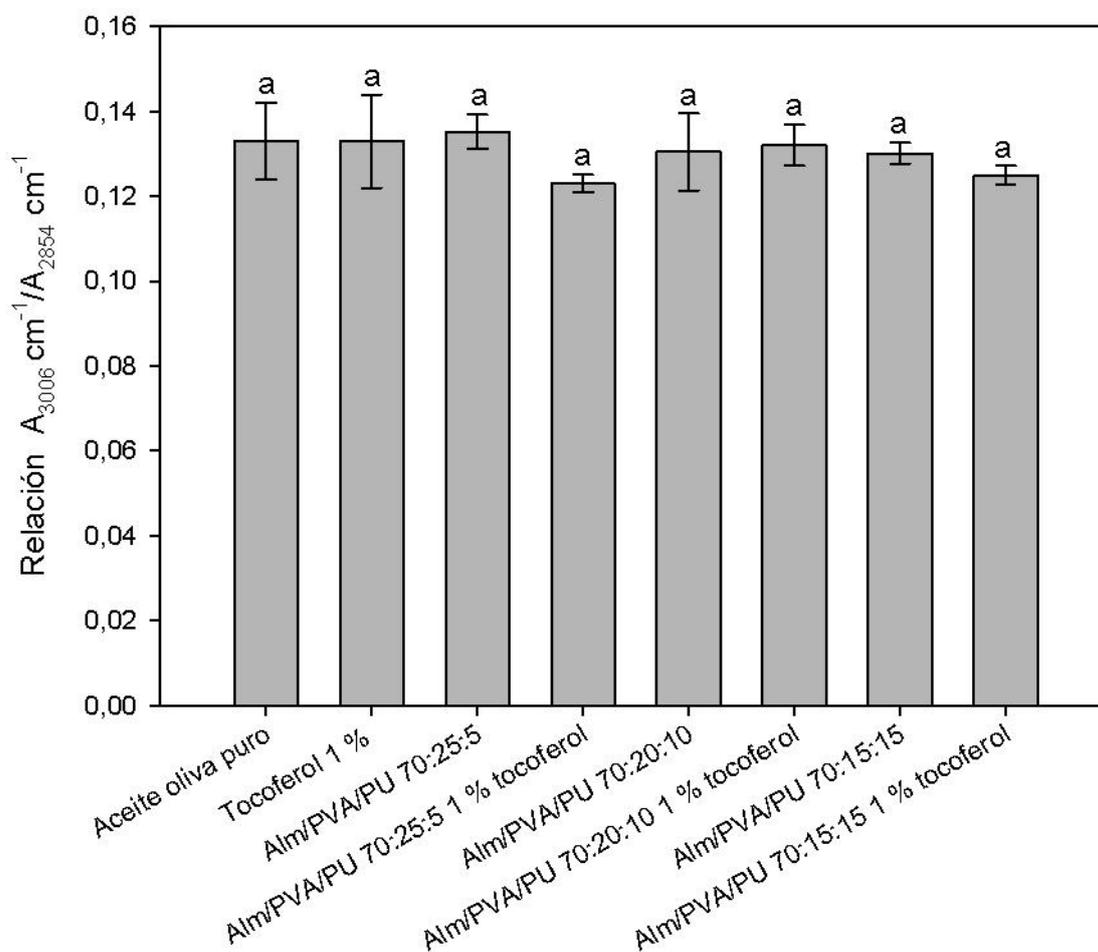
estiramiento de los dobles enlaces *cis* del C-H) para aceite de cártamo oxidado de forma acelerada sobre un cristal de ZnSe a 75 °C disminuye progresivamente. En la Figura 4.4 se puede observar la disminución en transmitancia de la señal en el espectro ATR-FTIR a 3006  $\text{cm}^{-1}$  luego de 42 días de ensayo, y cómo la banda a 2854  $\text{cm}^{-1}$  se presenta sin cambios (las señales fueron convertidas a absorbancia para los cálculos).



**Figura 4.4.** Espectro ATR-FTIR de aceite de oliva extra virgen puro al inicio y al final del ensayo acelerado de oxidación.

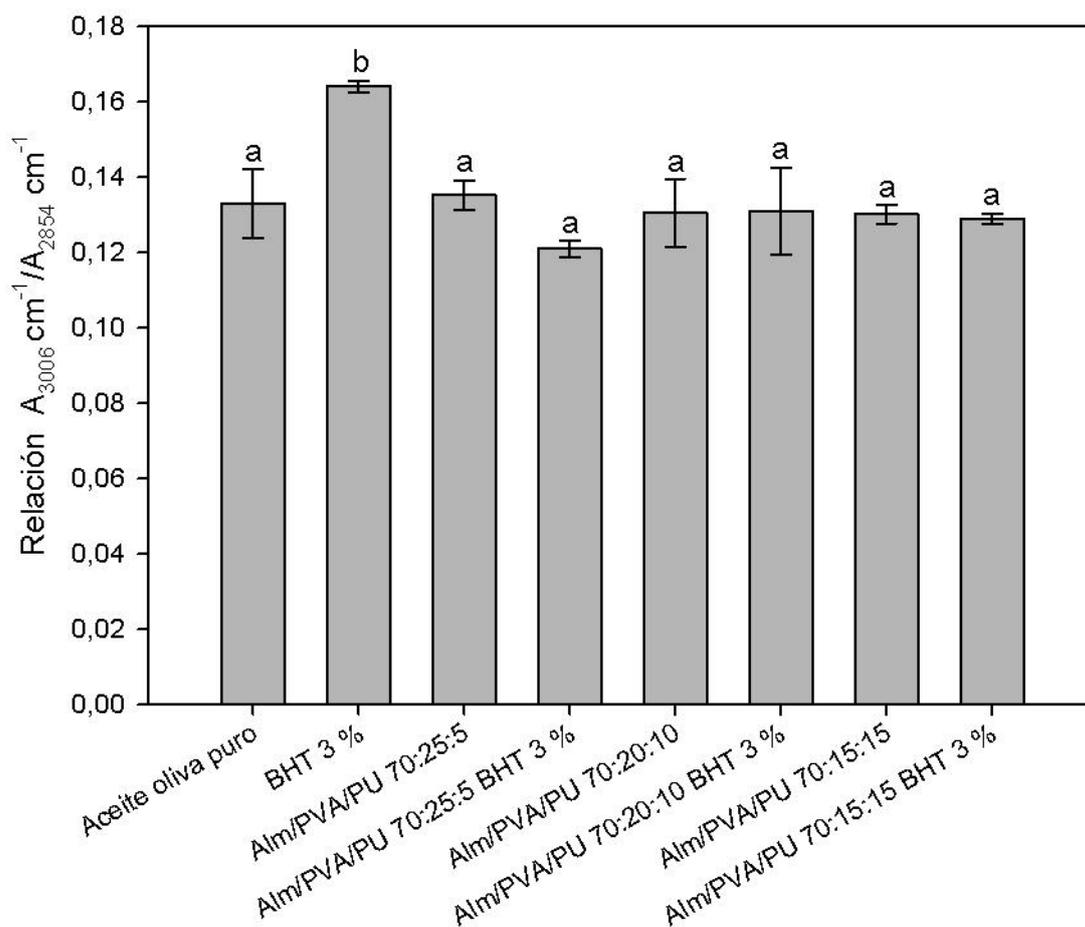
En la Figuras 4.5, 4.6 y 4.7 se muestran los valores obtenidos luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C para la relación de absorbancias de las señales mencionadas  $A_{3006\text{cm}^{-1}}/A_{2854\text{cm}^{-1}}$  para aceite de oliva extra virgen puro, aceite de oliva conteniendo concentraciones de 3 y 5 % p/p de BHT y 1 % p/p de  $\alpha$ -tocoferol, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo BHT al 3 y 5% p/p y  $\alpha$ -tocoferol al 1%p/p.

En general, se evidenció que las películas de base no tuvieron ninguna influencia en el proceso oxidativo, ya que cuando se las colocó en aceite el resultado fue el mismo que para el aceite de oliva puro.

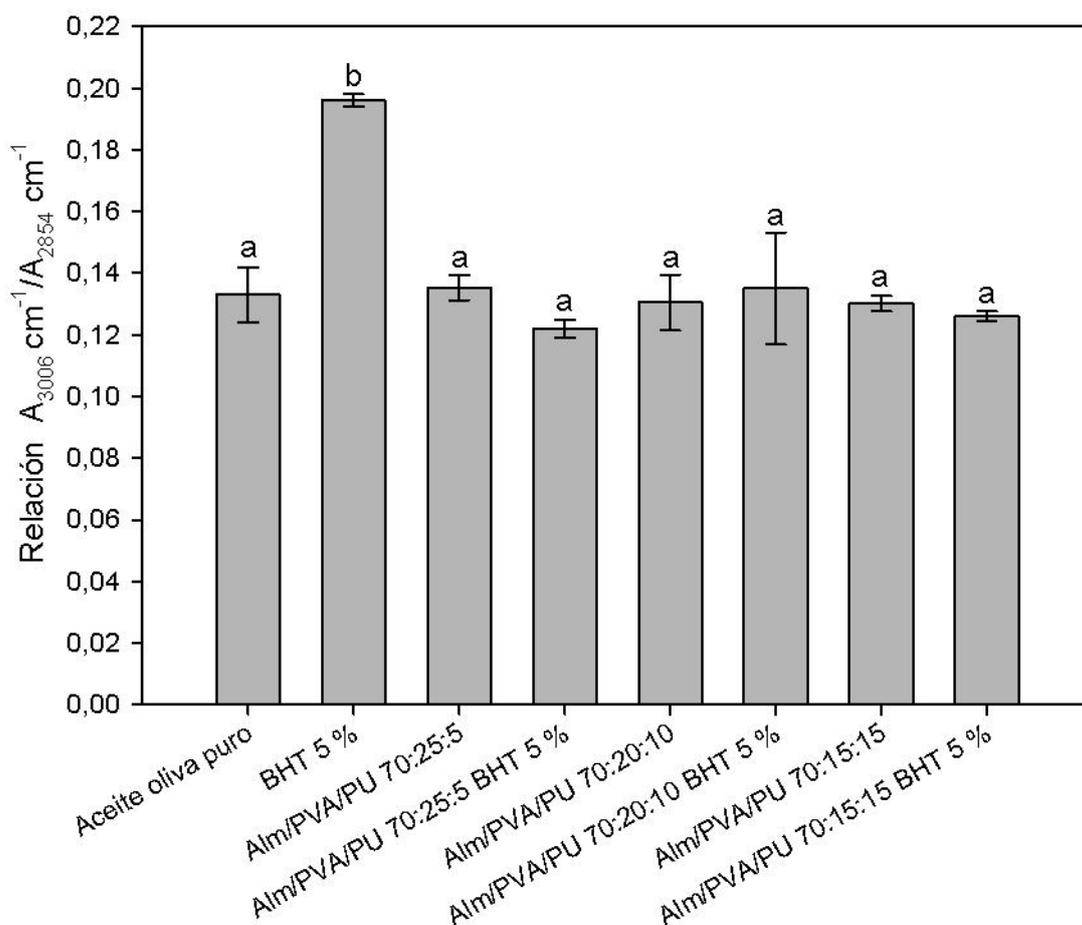


**Figura 4.5.** Relación  $A_{3006 \text{ cm}^{-1}}/A_{2854 \text{ cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 1 % p/p de  $\alpha$ -tocoferol, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo  $\alpha$ -tocoferol al 1 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Se puede observar en la Figura 4.5 que el  $\alpha$ -tocoferol al 1 % p/p adicionado directamente sobre el aceite de oliva no tuvo un efecto antioxidante, dado que la relación de absorbancia entre las señales estudiadas se mantuvo igual a la del aceite de oliva puro. Las películas conteniendo esa cantidad de  $\alpha$ -tocoferol tampoco ejercieron un efecto antioxidante; esto podría deberse a que, más allá de si se liberó total o parcialmente, la cantidad de componente activo no fue suficiente para lograr un efecto significativo.



**Figura 4.6.** Relación  $A_{3006 \text{ cm}^{-1}} / A_{2854 \text{ cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 3 % p/p de BHT, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo BHT al 3 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).



**Figura 4.7.** Relación  $A_{3006 \text{ cm}^{-1}} / A_{2854 \text{ cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 5 % p/p de BHT, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo BHT al 5 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Con respecto a las Figuras 4.6 y 4.7, en el caso del BHT puro tanto al 3 como al 5 %, se encontró que cuando se lo adicionó directamente sobre el aceite de oliva se evidenció un efecto antioxidante dado que la relación de absorbancia de las bandas  $3006/2854 \text{ cm}^{-1}$  fue mayor con respecto a la presentada por el aceite de oliva puro. El efecto fue mayor estadísticamente cuando se adicionó un 5 % (comparación estadística no mostrada).

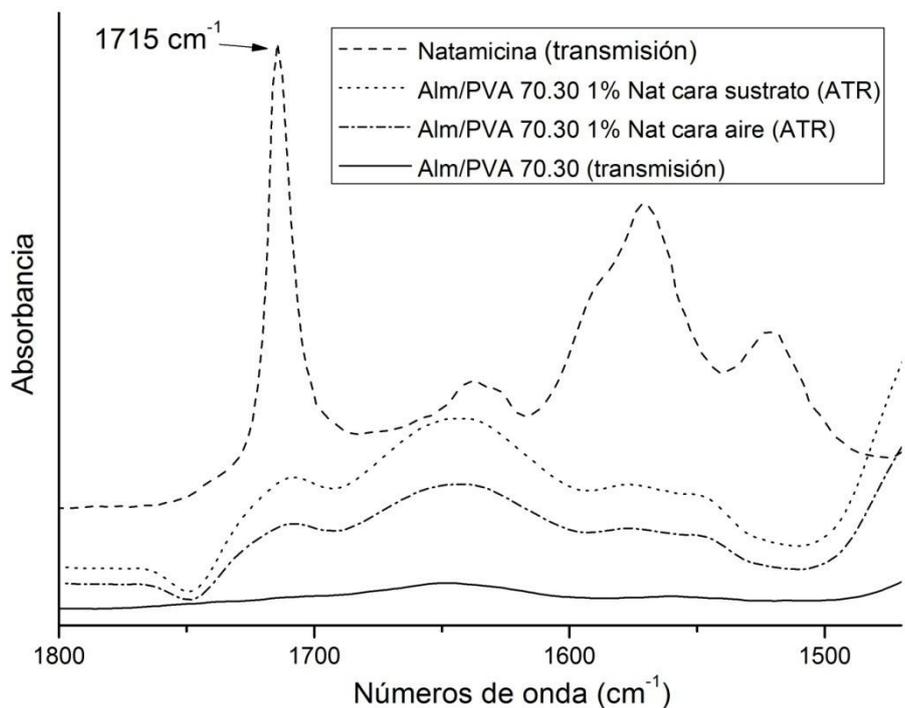
Se encontró que ninguna de las películas conteniendo BHT (tanto al 3 como al 5 %) pudo ejercer su efecto antioxidante sobre el aceite de oliva. En este

caso, al haber podido comprobar que el BHT en esas cantidades podía tener un efecto antioxidante significativo, se llegó a la conclusión de que las moléculas de BHT estaban interaccionando fuertemente con la matriz polimérica, de forma tal que no pudieron ser liberadas. La forma de incorporación del aditivo modifica su disponibilidad, como fue reportado recientemente por Pardini y col. (2015). En este caso, dada la naturaleza de la matriz y de los aditivos antioxidantes no se disponía de estrategias alternativas de incorporación (en la dispersión o por inmersión): la incorporación dentro de la dispersión formadora de película hace que el aditivo forme parte de la morfología de la película, interaccionando fuertemente e impidiendo eventualmente su liberación.

#### 4.5.1.3. Estudio de la distribución de natamicina en ambas caras de la película

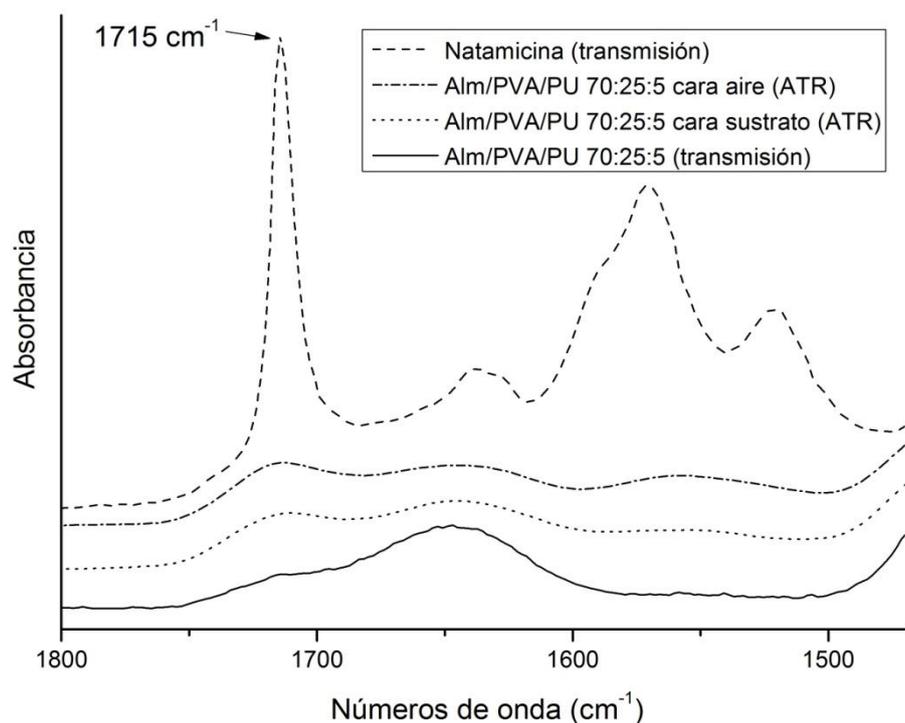
Para verificar si la natamicina se encontraba distribuida homogéneamente en la película, se realizó una comparación de los espectros de absorción por FT-IR con el accesorio ATR de ambas caras, estudiando particularmente la contribución de la banda del estiramiento de los carbonilos provenientes de los grupos ésteres conjugados del anillo de lactona de la natamicina a  $1715\text{ cm}^{-1}$ .

Del análisis para las películas de Alm/PVA 70:30, se puede concluir que la presencia de natamicina en la cara sustrato es mayor que la cantidad presente en la cara aire (Figura 4.8).



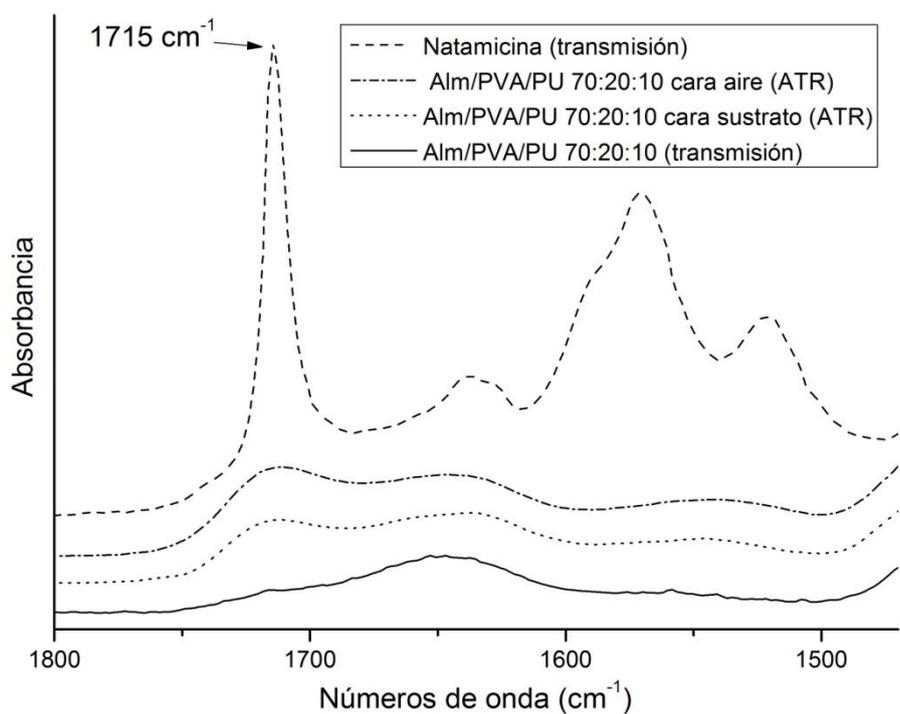
**Figura 4.8.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA 70:30 conteniendo 1 % de natamicina.

Para las películas 70:25:5 y 70:20:10 la tendencia se invierte (Figuras 4.9 y 4.10), siendo la cantidad de natamicina mayor en la cara aire que en la cara sustrato. Estas películas tienen un mayor componente hidrofóbico debido al reemplazo de parte del PVA por PU, lo que lleva a que la natamicina se distribuya preferentemente hacia la cara aire. Si bien la natamicina es anfifílica, por su estructura tiene un carácter más hidrofóbico, tal como lo indica su limitada solubilidad en agua (Thomas, 1976; Brik, 1981).



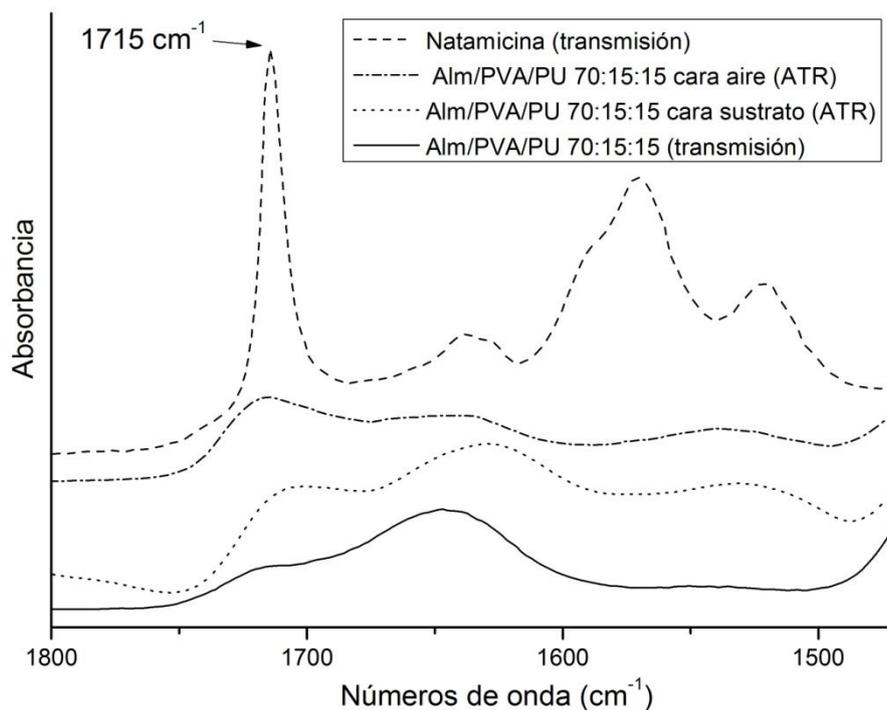
**Figura 4.9.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 conteniendo 1 % de natamicina.

Cuando sólo hay PVA en la formulación, la natamicina tiende a migrar hacia el sustrato cuando el frente de agua que se evapora avanza hacia la cara aire. En cambio, cuando se encuentra PU presente, el medio posee una característica más hidrofóbica y por tal razón la natamicina es más afín a la matriz y por ende se encuentra mejor distribuida, con lo cual al evaporarse el agua podría quedar con una distribución preferencial en la cara aire.



**Figura 4.10.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:20:10 conteniendo 1 % de natamicina.

Para las películas de Alm/PVA/PU 70:15:15 se puede observar una tendencia similar a la que presentaron las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 y 70:20:10, como se puede observar en la Figura 4.11, aunque en este caso existe en la zona de interés una contribución al espectro de absorción proveniente del PU que dificulta la observación del efecto puro de la adición de natamicina.



**Figura 4.11.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:15:15 conteniendo 1 % de natamicina.

La modificación de la distribución de la natamicina en la película como consecuencia de la incorporación del PU, podría ser de utilidad cuando se quiere lograr una distribución asimétrica en la matriz polimérica. Esto permitiría reducir el contenido total del aditivo y disponerlo selectivamente en la interfase con el sustrato.

#### 4.5.2. Aplicación de recubrimientos activos sobre quesos

Existen diferentes alternativas a la hora de estudiar la efectividad de un recubrimiento o envase activo. Algunos autores utilizan quesos fabricados en su propia planta, mientras otros autores realizan ensayos con porciones pequeñas de queso con el fin de evaluar de forma preliminar la eficiencia de su material, aplicando una película en contacto con el cubo de queso (Fajardo y col., 2010; Hanušová y col., 2010). Para el trabajo actual, se decidió trabajar con cubos de queso semiduro Tybo como sistema testigo, pero aplicar el material a estudiar en

forma de recubrimiento, de forma tal de dar un paso más en la evaluación de lo que sería una potencial aplicación en industria.

Se ha estudiado que el método de aplicación del recubrimiento activo tiene una gran influencia sobre los resultados posteriores: es conveniente conseguir el mayor contacto posible entre la superficie del queso y el recubrimiento, ya que esto tiene una influencia directa sobre la eficiencia de migración del compuesto activo (Hanušová y col., 2012; Bierhalz y col., 2013).

#### 4.5.2.1. Espesor de recubrimiento

En primera instancia, se intentó completar las capas sucesivas mediante aplicación con pincel (pintado) pero no resultó eficiente, por lo que finalmente se decidió hacerlo por inmersión de los cubos de queso en las dispersiones concentradas. La solución de negro de eriocromo T se desestabilizó al cubrir los quesos (indicado en la Figura 4.12), por lo que se decidió descartar estas muestras.

Para la determinación del espesor de los recubrimientos, entonces, se trabajó en esta instancia con los quesos recubiertos con mezclas conteniendo cristal violeta ya que fue el que mostró límites más definidos y con menos difusión hacia el interior del queso.

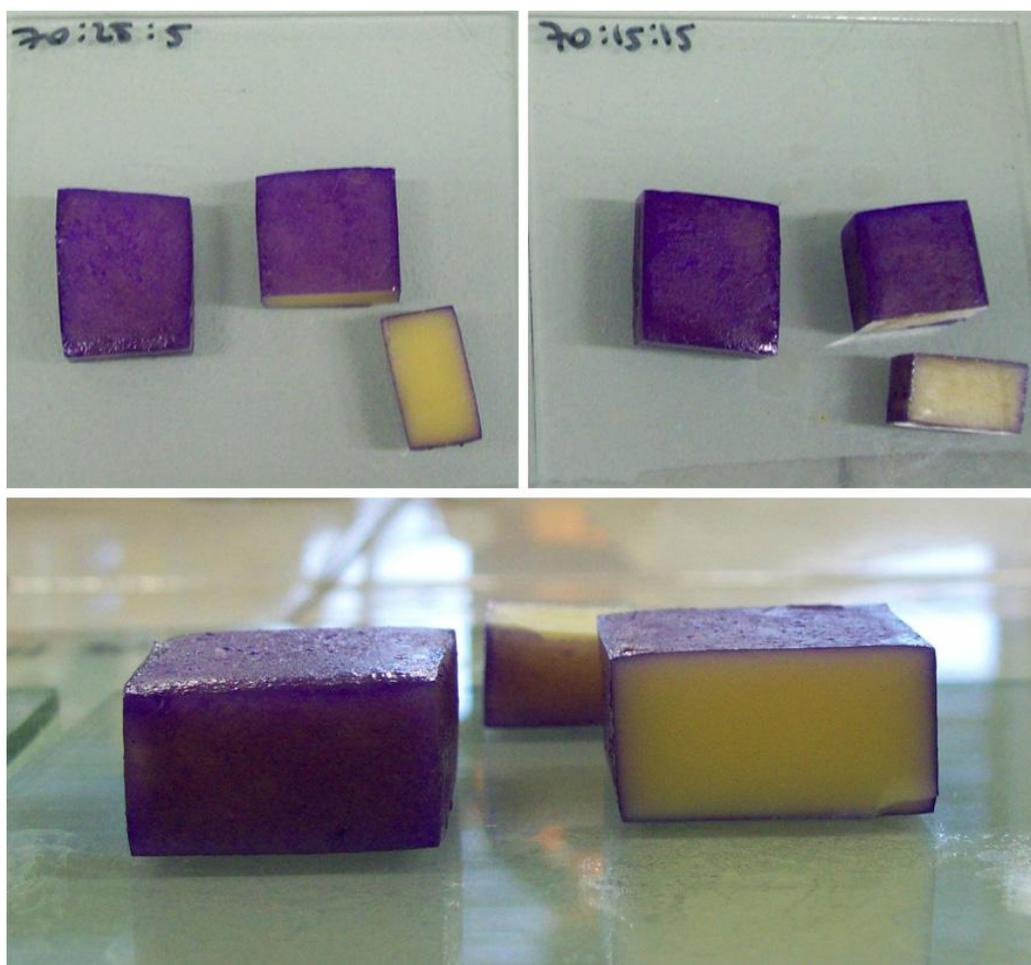


**Figura 4.12.** Fotografías de trozos de quesos recubiertos con películas dopadas con diferentes colorantes.

Se llevaron a cabo las mediciones del espesor del recubrimiento obteniéndose un espesor promedio de  $55 \pm 5 \mu\text{m}$  como resultado de tres capas sucesivas por inmersión, lo cual resultó similar al espesor de película que se obtuvo por *casting* para las películas que se estudiaron con técnicas de

caracterización de materiales. Por este motivo se decidió trabajar para los ensayos aplicados con este sistema.

En la Figura 4.13 se muestran imágenes de los cubos de queso recubiertos con solución de cristal violeta y se observa el límite del recubrimiento al realizar un corte.



**Figura 4.13.** Cubos de queso Tybo recubiertos con dispersión polimérica con colorante cristal violeta y corte de los mismos para medir espesor del recubrimiento aplicado.

#### 4.5.2.2. Ensayo de difusión de natamicina hacia la masa de queso semiduro

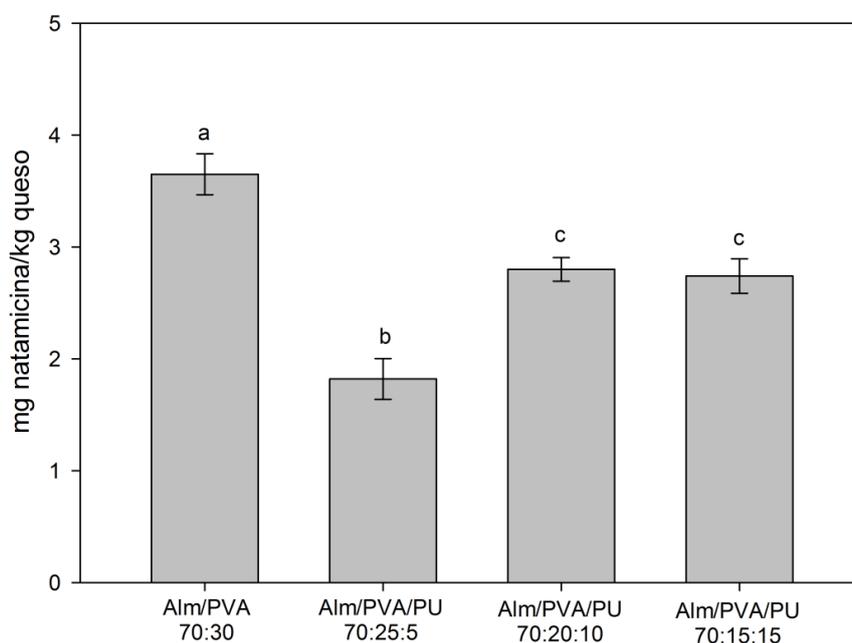
En primera instancia, se obtuvieron los extractos de queso en MeOH:H<sub>2</sub>O para cada muestra. De Ruig y col. (1987) plantearon la posibilidad de, luego de obtener un extracto del queso, estudiar la presencia de natamicina por vía espectrométrica con UV, mientras que la norma ISO 9233 (2013a; 2013b) y Vierikova y col. (2015) propusieron como alternativa de mayor sensibilidad

concentrar los extractos y estudiarlos por HPLC-espectroscopia de masa acoplados. Para nuestro objetivo la sensibilidad de la técnica con espectrometría UV fue adecuada ya que se trabajó con un límite de detección de 0,5 mg natamicina/kg de queso.

Previamente, se realizaron las curvas de calibración correspondientes al mínimo de absorbancia a 311,5 nm, y también para los máximos a 318 y 329 nm, eligiéndose como mejores ajustes las curvas para 311,5 y 329 nm.

Para obtener el “blanco” se utilizó una solución de MeOH:H<sub>2</sub>O en relación 2:1. Previamente se llevó a cabo la corroboración de que esta solución era un “buen blanco”, ya que se realizó el procedimiento para obtener un extracto de un queso sin recubrimiento, y el espectro obtenido fue igual al de la solución MeOH:H<sub>2</sub>O (no mostrado).

En la Figura 4.14 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de natamicina en la masa del queso luego de descartar los 2 mm superficiales de cubos de queso recubiertos con mezclas concentradas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 conteniendo 1 % de natamicina.



**Figura 4.14.** Contenido de natamicina en la masa del queso expresado como mg de natamicina/kg de queso para cubos de queso recubiertos con mezclas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 aditivadas con 1 % de natamicina. Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ )

En todos los casos se encontró natamicina en la masa y se pudo cuantificar. Los recubrimientos de Alm/PVA/PU mostraron menor liberación de natamicina que la mezcla Alm/PVA. Dentro de las mezclas ternarias, la que mostró menor difusión de natamicina fue la 70:25:5. Las interacciones entre los componentes de la película y la natamicina, y la naturaleza anfótera y anfífila de la natamicina en sí (Brik, 1981), determinan en cada caso un comportamiento diferente en cuanto a la difusión de natamicina hacia la masa del queso. El carácter hidrofóbico del PU puede limitar la difusión de la natamicina que, a pesar de ser considerada anfífila, presenta, como ya se indicó, un carácter más hidrofóbico por su estructura (Thomas, 1976).

Según el CAA, a 2 mm de profundidad no debería detectarse natamicina presente. El CAA también establece como condición que en la superficie de un queso no debe aplicarse natamicina en una relación mayor a 1 mg/dm<sup>2</sup> de superficie. Se decidió entonces evaluar el desempeño de recubrimientos sobre queso conteniendo 0,1 % de natamicina además de los que contienen 1 %, de forma tal de estudiar no sólo si los recubrimientos son efectivos sino también la efectividad que tendría un recubrimiento que puede ser aplicado cumpliendo los requisitos del CAA.

#### 4.5.3. Ensayos microbiológicos

##### 4.5.3.1. Aislamiento de cepas

Una práctica interesante a la hora de evaluar la efectividad de un recubrimiento para quesos es realizar los estudios con microorganismos aislados directamente de ambientes relacionados: salas de maduración, salas de elaboración, o directamente de la superficie de quesos enmohecidos (Basílico y col., 2001; Hanušová y col., 2010; Hanušová y col., 2012; Moatsou y col., 2015). En este trabajo se recurrió a la aislación de hongos de la superficie de quesos enmohecidos provenientes de salas de maduración, obteniéndose tres cepas de *Penicillium*: spp 1, spp 2 y spp 3. Estos microorganismos son potenciales productores de micotoxinas peligrosas para la salud (Hocking, 1997; Basílico y col., 2001; Hanušová y col., 2012).

#### 4.5.3.2. Estudio de sensibilidad de las películas frente a *Penicillium spp.*

En este estudio se encontró que en las placas inoculadas e incubadas a 28 °C con las cepas de *Penicillium spp* no hubo biodeterioro visible importante. Sin embargo, en las placas incubadas en frío se observó un enmohecimiento con *Penicillium spp* y contaminación de mohos ambientales (Fam. Dematiaceae; Clase Deuteromycetes) siendo las más frecuentes *Alternaria sp* y *Cladosporium sp* (Figura 4.15). Con menor frecuencia, se aislaron *Aspergillus Niger sp*, *Fusarium sp* y *Mucor sp*.



**Figura 4.15.** Película Alm/PVA 70:30 sobre agar con crecimiento de hongos ambientales *Alternaria sp* y *Cladosporium sp*.

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados de crecimiento de microorganismos para películas sobre vidrio simple, doble vidrio tipo “sándwich” y agar al 2 %, a 28 °C y en frío a 4-6 °C. La escala utilizada fue de “-” a “+++”, donde “-” simboliza que no hubo crecimiento y “+” simboliza crecimiento, a mayor número de símbolos, mayor crecimiento.

**Tabla 4.3.** Crecimiento de microorganismos para películas de Almidón puro (Alm), PVA puro (PVA), Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15, expuestas al ambiente y sobre vidrio simple, doble vidrio tipo sándwich y agar al 2%, a 28 °C y en frío a 4-6 °C inoculadas con *Penicillium spp 1* y *spp 2*.

<b>Películas expuestas al ambiente sin inocular durante 45 días</b>						
	<b>ALM</b>	<b>PVA</b>	<b>70:30</b>	<b>70:25:05</b>	<b>70:20:10</b>	<b>70:15:15</b>
Películas expuestas al ambiente	+	-	+++	+++	+++	+++
<b>Películas inoculadas con <i>Penicillium spp 1</i> y <i>spp 2</i> durante 45 días</b>						
	<b>ALM</b>	<b>PVA</b>	<b>70:30</b>	<b>70:25:05</b>	<b>70:20:10</b>	<b>70:15:15</b>
Películas en placa, incubadas a 28°C, "sándwich"	+	++	++	+++	+++	+++
Películas en placa, incubadas a 28°C, simple	+	+++	+++	+++	+	+
Agar 2%, 28°C	+++	-	+++	+++	+++	+++
Películas en placa, incubadas en frío, "sándwich"	++	-	+++	+++	+++	++
Películas en placa, incubadas en frío, simple	+	-	++	+++	++	-
Agar 2% incubadas en frío	+++	-	+++	+++	+++	+++

Cuando se detectó crecimiento fúngico, simbolizado con símbolos "+", en todos los casos correspondió a desarrollo de la cepa inoculada de *Penicillium spp* en conjunto con mohos ambientales. Para las películas expuestas al ambiente, sólo se registró crecimiento de mohos ambientales, dado que no hubo inoculación de las películas. Estos mohos ambientales encontrados en todas las muestras que presentaron crecimiento fúngico fueron aislados y analizados posteriormente. En este ensayo, sólo las películas de PVA puro no tuvieron desarrollo microbiano. Todas las muestras que contenían almidón evidenciaron crecimiento de hongos cuando se las expuso al ambiente en un ambiente de alta humedad.

Con respecto a las películas inoculadas con cepas de *Penicillium spp*, las películas de PVA puro sólo desarrollaron mohos cuando se incubaron a 28 °C en placa. Contrariamente, las películas de almidón puro mostraron un alto grado de desarrollo fúngico en agar, pero no tanto sobre vidrio simple o en "sándwich". En general, todas las películas que contenían almidón mostraron un gran desarrollo fúngico luego de 45 días en agar, tanto en frío como a 28 °C, posiblemente porque el agar constituyó una superficie húmeda en contacto directo.

Las películas Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA 70:25:5 en los sistemas con vidrio mostraron gran crecimiento. En cambio, las películas Alm/PVA/PU 70:20:10 y 70:15:15 desarrollaron gran crecimiento a 28 °C en vidrio tipo "sándwich" pero no tanto en vidrio simple.

Se debe considerar que todas las muestras estaban expuestas a ambientes de alta humedad, ya fuera por la presencia de un papel húmedo en la base de las cajas o por el agar en sí, lo cual sumado a la temperatura de 28 °C en algunos casos, ofrecía buenas condiciones para el desarrollo de mohos, dado que además las películas están conformadas en un 70 % por almidón. Es interesante observar que, en algunos casos, en los sistemas tipo "sándwich" hubo más desarrollo de mohos que en los sistemas de vidrio simple, para una misma muestra: una vez que el moho colonizó la película, se desarrolló mejor en un ambiente limitado entre dos superficies.

Con respecto a lo sucedido a lo largo de los 45 días de ensayo (datos no mostrados en la Tabla 4.3), las muestras incubadas en frío tardaron más en mostrar desarrollo fúngico: cuando las películas incubadas a 28 °C evidenciaban crecimiento de mohos, las placas en frío no, y esta condición se mantuvo hasta el

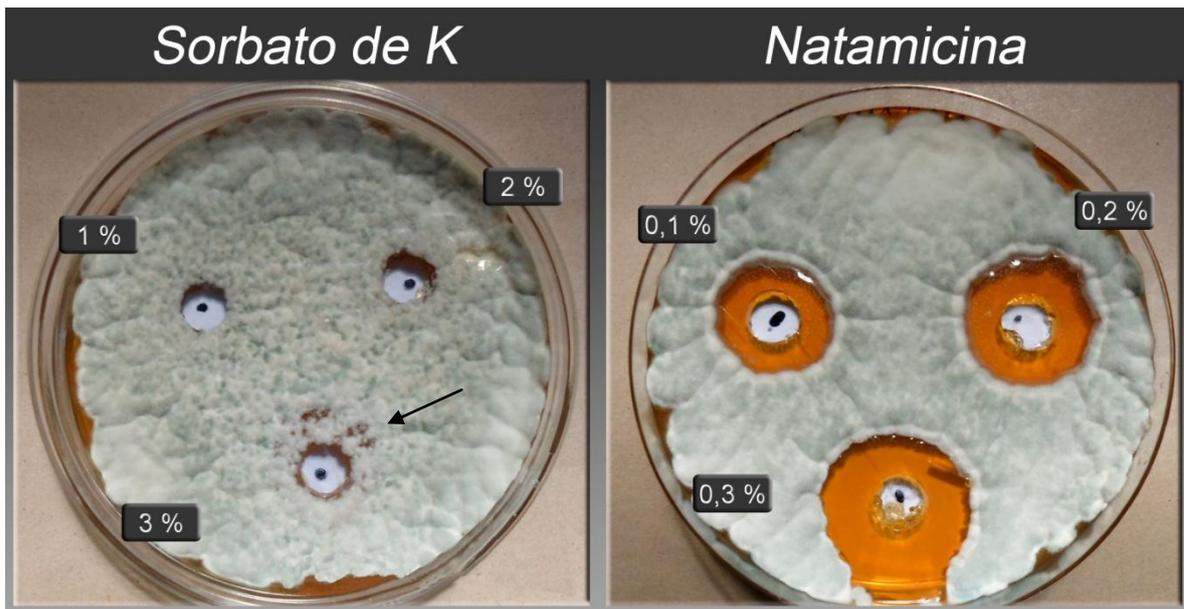
día 20 del ensayo. Para cuando se alcanzaron los 30 días de ensayo, algunas placas en frío mostraban también desarrollo.

Es evidente que el factor temperatura fue determinante para retrasar el desarrollo de mohos, aunque para el final del estudio todas las muestras que contenían almidón mostraron crecimiento de hongos. Esto es importante si se piensa en una potencial maduración de quesos en una sala a 13 °C, que ofrecería un ambiente intermedio entre las dos condiciones ensayadas.

#### 4.5.3.3. Evaluación de la capacidad antimicrobiana (antimicogramas)

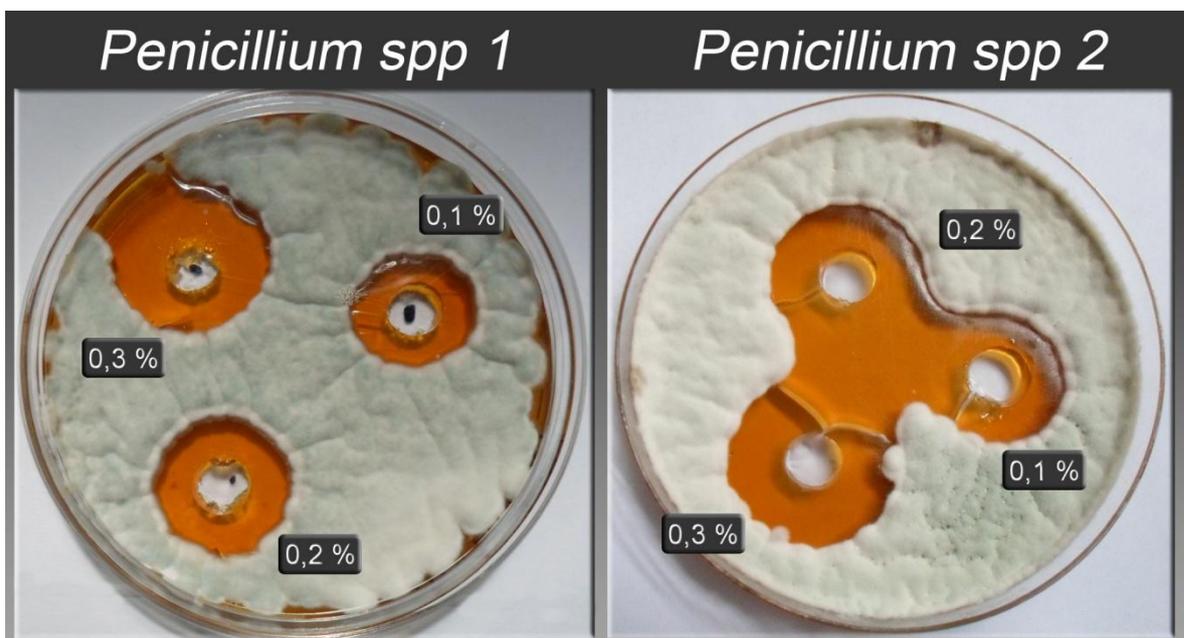
Se utilizaron dos tipos de natamicina, ambas al 50 %, una con 50 % de NaCl, y la otra con 50 % de goma xántica. La natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid Salt en concentraciones de 0,1; 0,2 y 0,3 % (Figura 4.16) posee actividad inhibitoria frente a *Penicillium spp*, siendo mayor a mayor concentración de antifúngico. Estas concentraciones utilizadas son superiores a las CMI propuestas por De Boer y Stolk-Horsthuis (1977). La capacidad inhibitoria de la natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1 se evaluó en conjunto con las películas cargadas, y se muestra en la Figuras 4.21 a 4.24 en la sección 4.5.3.4. Se encontró que la natamicina con goma xántica posee mayor capacidad inhibitoria que la que contiene NaCl; esto puede deberse a que la mezcla XT1 permite una distribución más homogénea y una mejor dispersión en agua de la natamicina en la solución a 40 °C, y por lo tanto también en la dispersión empleada para la preparación de las películas. Por este motivo, se eligió la Natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1 para evaluar el desempeño de películas cargadas.

El Sorbato de K en solución acuosa al 1% inhibe en forma escasa, mientras que al 2-3 % posee casi la misma actividad frente a *Penicillium spp*; aunque entre las 72 y 96 horas, las placas fueron invadidas totalmente por la cepa en estudio, perdiéndose completamente la efectividad del sorbato como antifúngico (Figura 4.16). En conclusión, el sorbato de potasio perdió acción fungistática a las 96 hs, y por este motivo se descartó como potencial antifúngico para dopar o aditivar las películas.

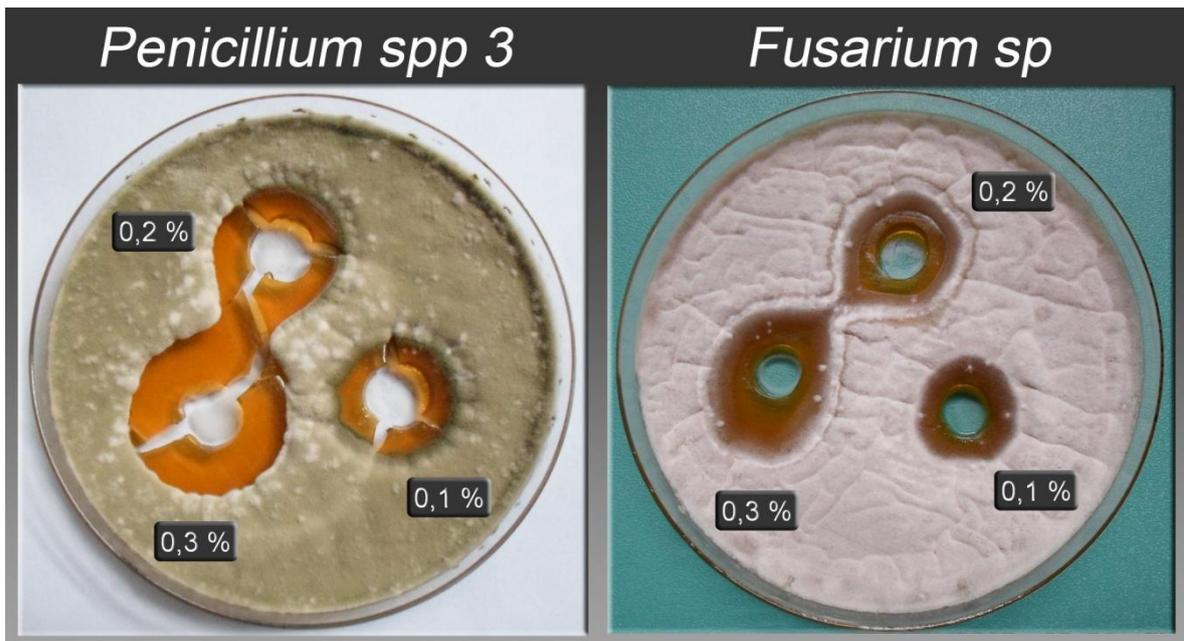


**Figura 4.16.** Placa inoculada con *Penicillium spp 1* luego de 96 hs de incubación con (a) sorbato de potasio en solución al 1, 2 y 3 % y (b) natamicina en solución al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

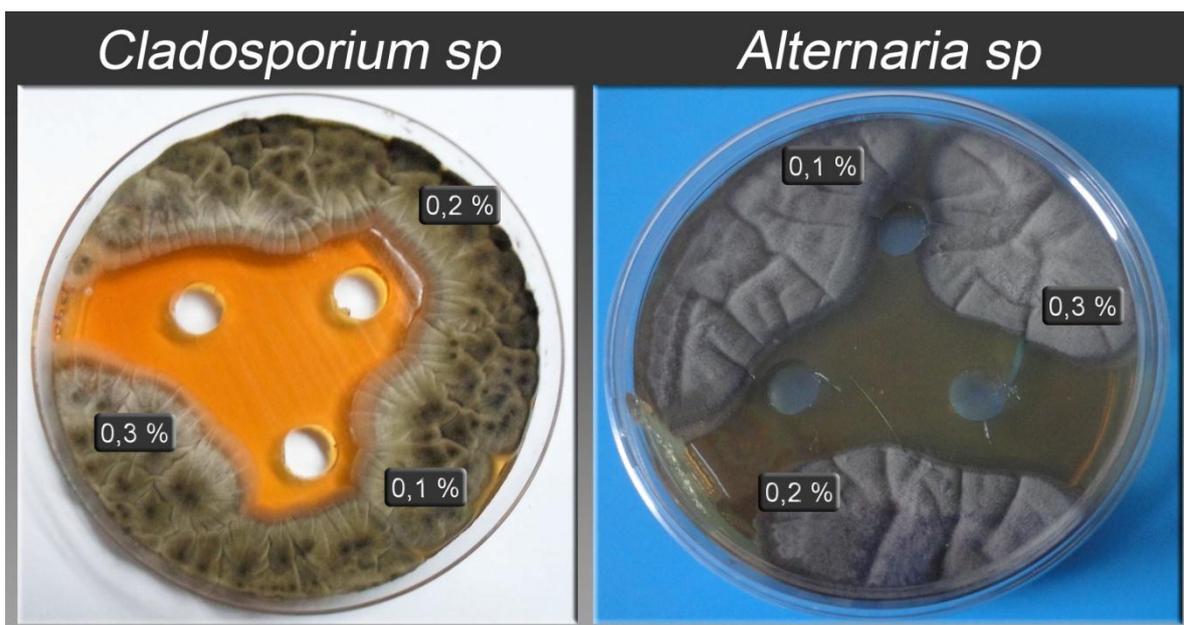
En las Figuras 4.17 a 4.20 se pueden observar los antimicogramas de las diferentes cepas de *Penicillium spp* y de mohos ambientales estudiados contra natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid Salt luego de 96 hs de incubación.



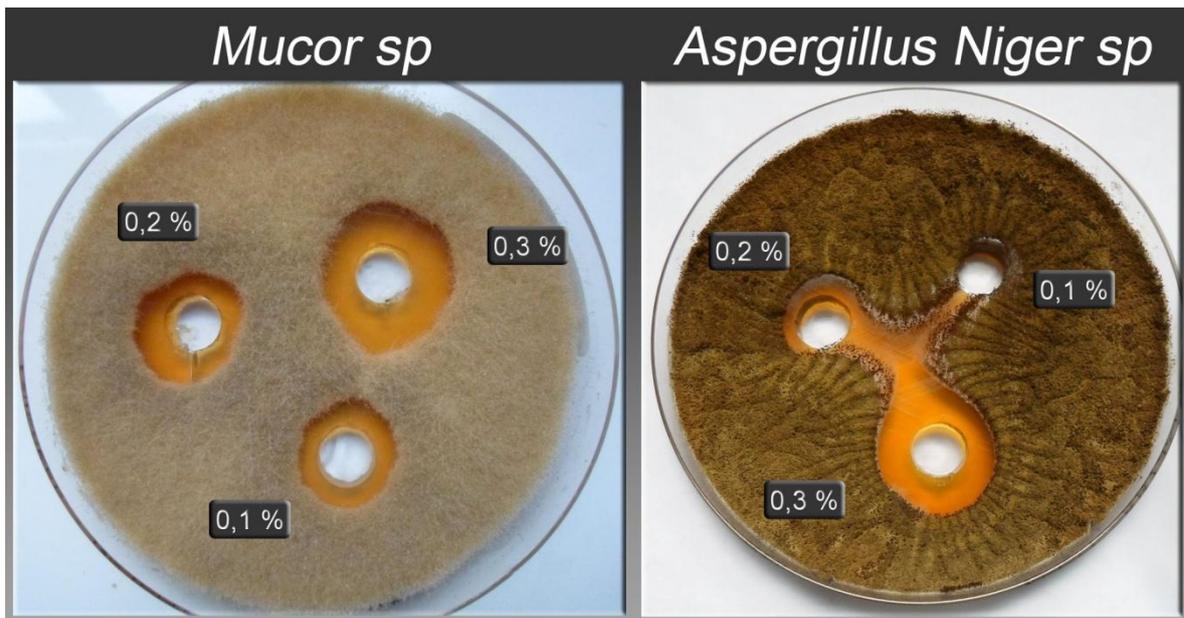
**Figura 4.17.** Antimicogramas para *Penicillium spp 1* y *spp 2* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.



**Figura 4.18.** Antimicogramas para *Penicillium spp 3* y *Fusarium sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.



**Figura 4.19.** Antimicogramas para *Cladosporium sp* y *Alternaria sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.



**Figura 4.20.** Antimicogramas para *Mucor sp* y *Aspergillus Niger sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

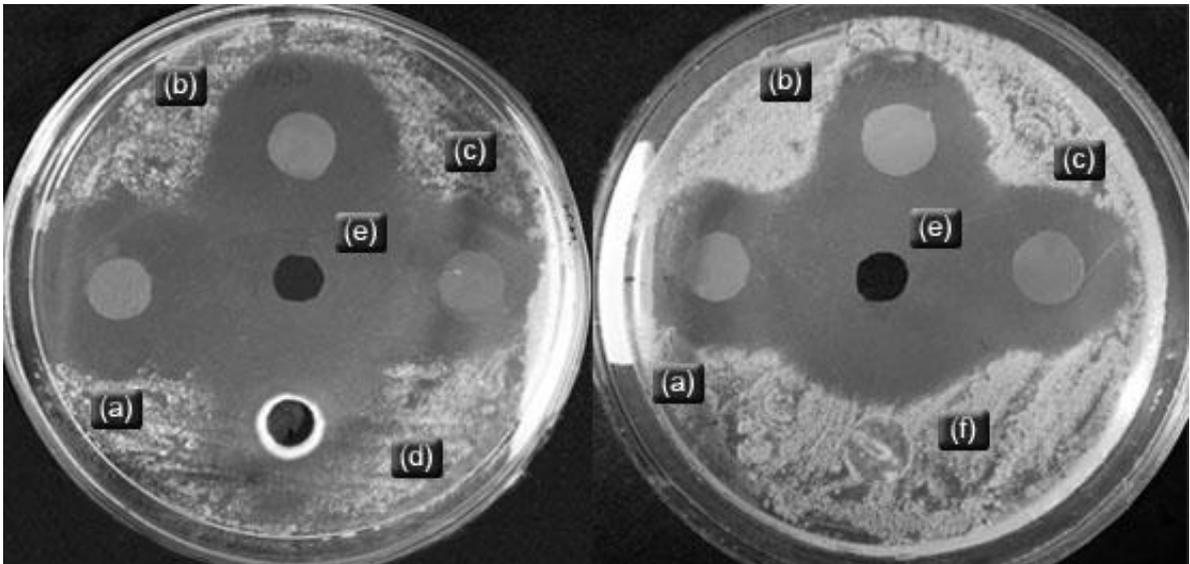
Se puede observar que para todas las muestras la inhibición se hace mayor conforme se incrementa la cantidad de natamicina en solución y en todos los casos, la solución de natamicina al 0,3 % mostró halos de inhibición definidos. Para concentraciones menores, hubo variación en la eficiencia de la inhibición del crecimiento de cada hongo destacándose como poco efectiva la concentración de 0,1 % frente a *Alternaria sp* y *Aspergillus Niger sp*.

Por último, en base a los resultados obtenidos, se asumió que la natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1 también sería efectiva frente a las cepas de mohos ambientales.

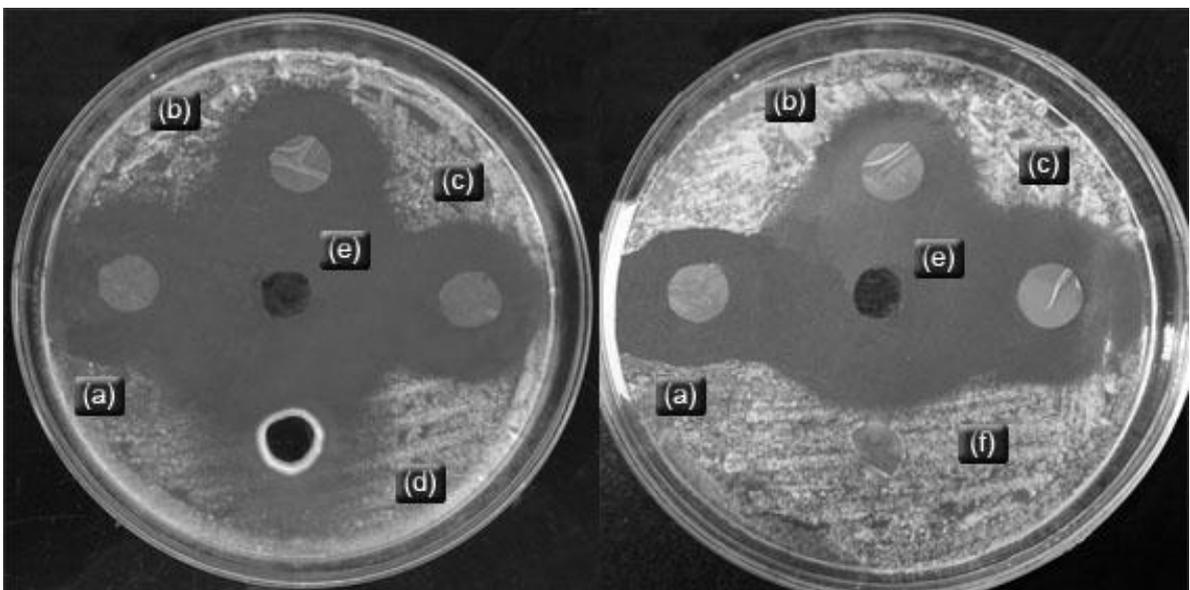
#### 4.5.3.4. Evaluación de desempeño antifúngico de películas cargadas con natamicina

Como se puede observar comparando las Figuras de la sección 4.5.3.2 y la 4.5.3.3, la natamicina en solución acuosa al 0,1 % con goma xántica posee mayor capacidad inhibitoria que la que contiene NaCl; y por este motivo, se eligió la Natamicina Delvo<sup>®</sup>Cid XT1 para evaluar el desempeño de películas cargadas frente a *Penicillium spp*. En las Figuras 4.21 a 4.23 se presentan los resultados obtenidos para placas incubadas conteniendo *Penicillium spp* frente a películas

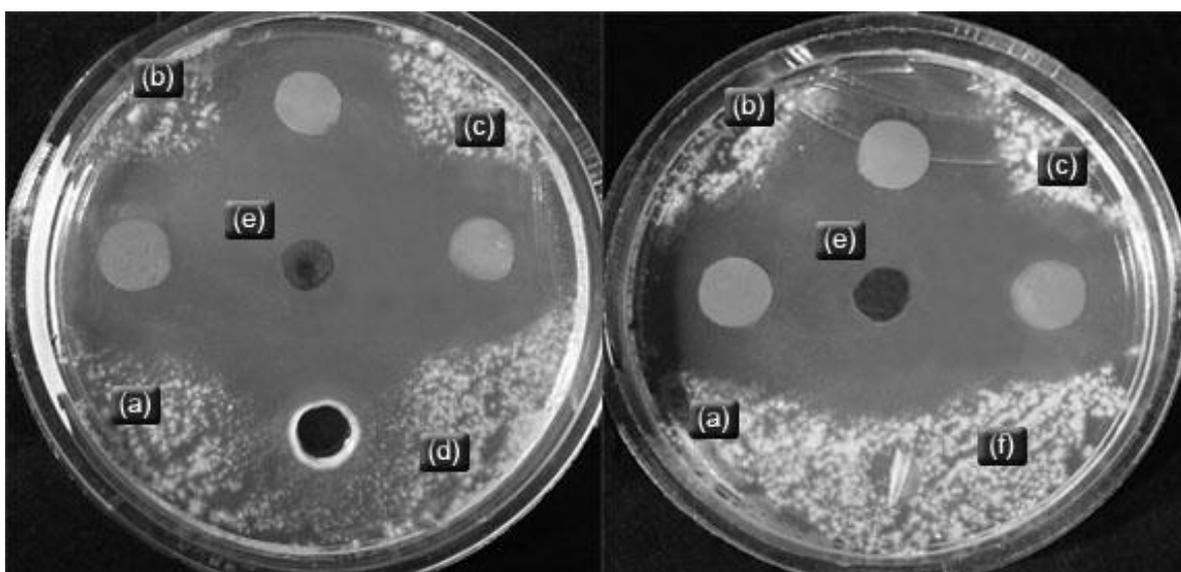
control, películas conteniendo natamicina al 0,1 % y soluciones de natamicina y PU.



**Figura 4.21.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1% de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1 % p/p y (f) película control Alm/PVA 70:30 frente a *Penicillium spp 1*.



**Figura 4.22.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1% de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1 % p/p y (f) película control Alm/PVA/PU 70:15:15 frente a *Penicillium spp 2*.



**Figura 4.23.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1 % de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1% p/p y (f) película control Alm/PVA/PU 70:25:5 frente a *Penicillium spp 3*.

En la Tabla 4.4 se presentan los resultados para los valores de halos de inhibición medidos. Las películas control no presentaron halos de inhibición por lo que no se incluyen los datos en la tabla.

**Tabla 4.4.** Diámetros de halos de inhibición (mm) para películas de Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:15:15 aditivadas con 0,1 % de natamicina; PU y natamicina al 0,1 % p/p en solución.

PELICULAS	Halos de inhibición en mm		
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
	<i>spp 1</i>	<i>spp2</i>	<i>spp 3</i>
Alm/PVA 70:30 0,1 % Nat	29,5 <sup>a</sup>	27,5 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:25:5 0,1 % Nat	26,5 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	31 <sup>a</sup>
Alm/PVA/PU 70:15:15 0,1 % Nat	29 <sup>a</sup>	28,5 <sup>a</sup>	32,5 <sup>a</sup>
Poliuretano puro*	40,5 <sup>b</sup>	49,5 <sup>cd</sup>	50,5 <sup>d</sup>
Natamicina 0,1 % solución	44 <sup>bc</sup>	44 <sup>bc</sup>	43,5 <sup>bc</sup>

\* Datos de un ensayo previo

Letras iguales indican medias iguales (test de Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

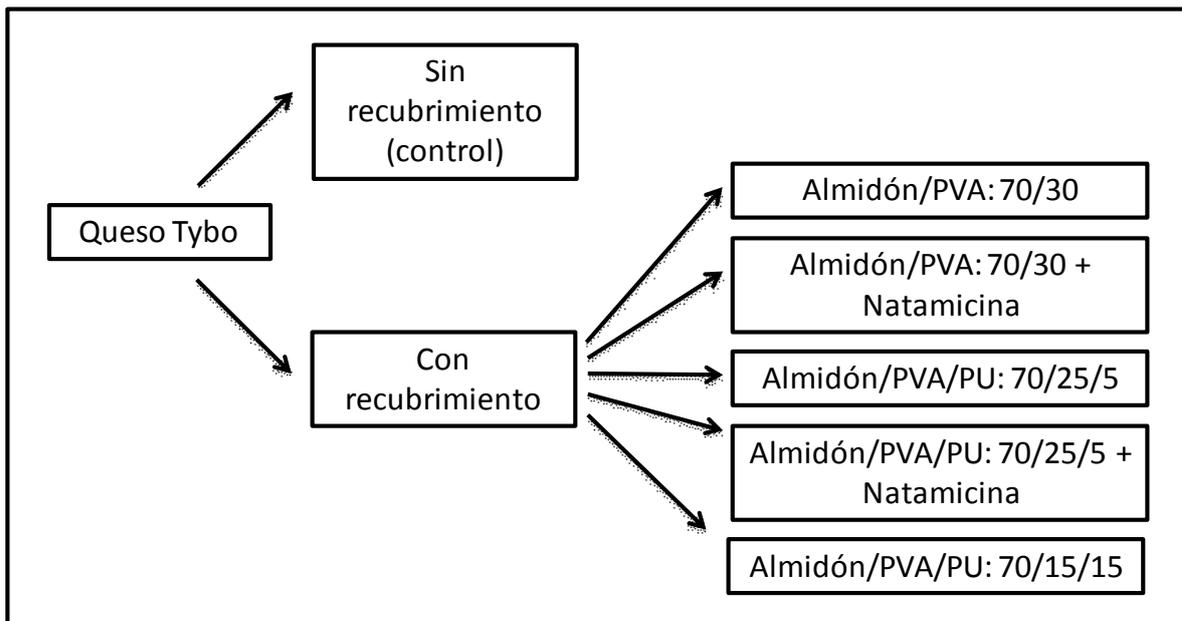
Estos resultados mostraron que:

- La natamicina en solución al 0,1 % tiene un efecto inhibitorio significativo sobre las 3 cepas de *Penicillium spp* estudiadas, y este efecto es igual para todas las cepas.
- El PU puro aplicado en dispersión acuosa también presenta un efecto inhibitorio significativo frente a las 3 cepas estudiadas, aunque este efecto fue mayor contra *Penicillium spp 2* y *spp 3* que contra *Penicillium spp 1*.
- La natamicina en solución al 0,1 % tiene un efecto inhibitorio similar al PU en dispersión frente *Penicillium spp*. Se destaca el PU frente a *Penicillium spp 3* como más efectivo.
- Las películas cargadas con natamicina al 0,1 % mostraron un efecto inhibitorio significativo, aunque menor al que mostraron tanto la natamicina en solución en la misma concentración como el PU en dispersión. Este efecto fue el mismo estadísticamente para todas las formulaciones de películas frente a las 3 cepas. Las interacciones entre los componentes que conforman la película producen que la natamicina esté menos disponible para actuar cuando se la incorpora en las películas como compuesto activo.

Hanuvosa y col. (2012) estudiaron la liberación de natamicina desde films de PVC conteniendo una cantidad de natamicina que resulta en la superficie del queso 7,1 mg/dm<sup>2</sup>, en placas de Petri conteniendo hongos aislados de la superficie de un queso blando (*Penicillium spp.* y *Cladosporium spp.*, principalmente), encontrando halos de inhibición para todas las cepas frente a la película activa. De Oliveira y col. (2007) ensayaron películas a base de celulosa de 33 y 95 µm de espesor conteniendo natamicina entre 0,2 y 4 %, frente a una cepa de *Penicillium roquefortii*, encontrando que se necesitó un mínimo de 2 % de natamicina en las películas de 33 µm para un control efectivo y que las películas de 95 µm resultaban poco flexibles y no se adherían al agar. Estos autores también destacan la importancia de estudiar la diferencia entre la efectividad de la natamicina en solución y la natamicina contenida en una película polimérica.

#### 4.5.4. Ensayos de conservación de queso en condiciones de maduración

Los ensayos de conservación de cubos de queso testigo se llevaron a cabo utilizando las siguientes muestras (Figura 4.24):

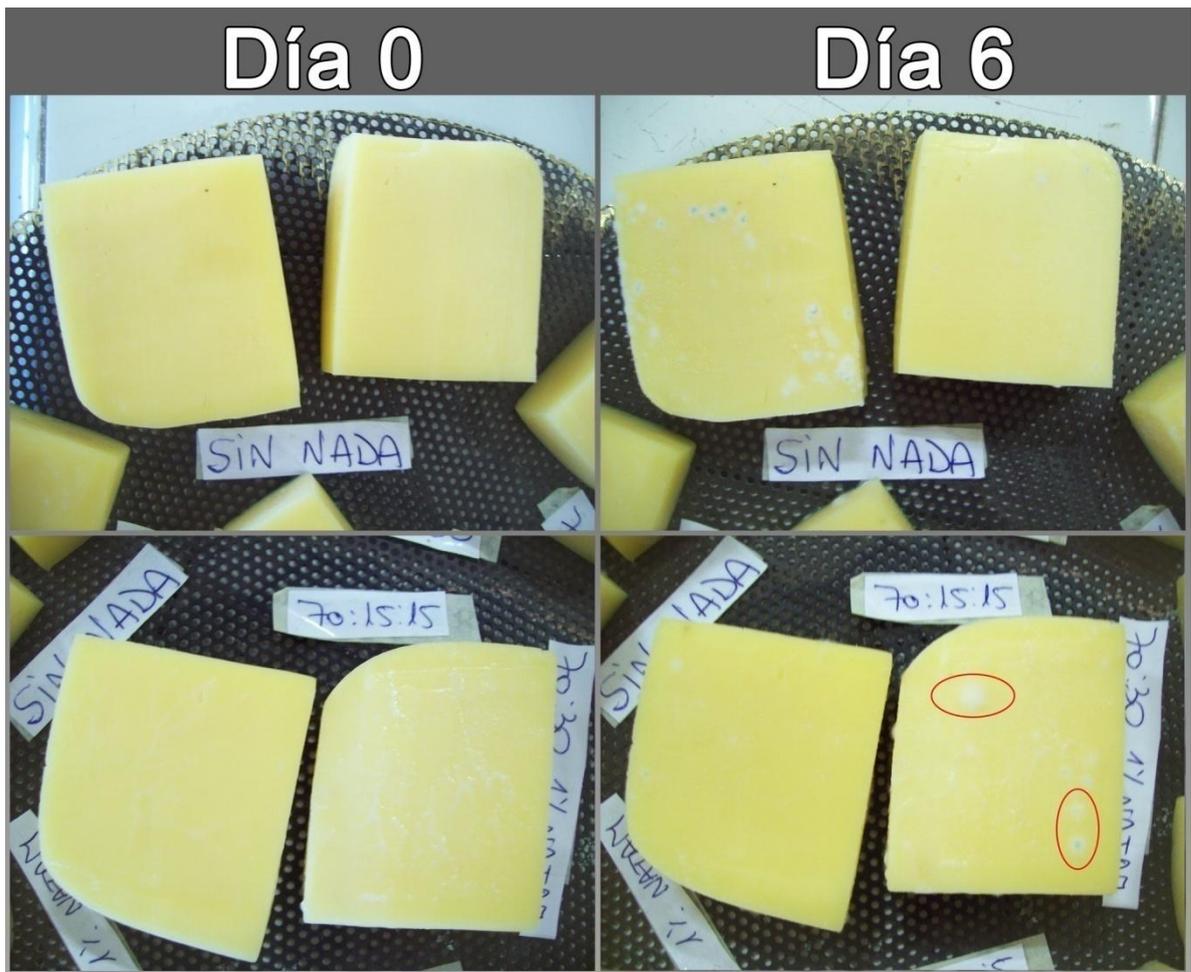


**Figura 4.24.** Esquema de trabajo para el ensayo de conservación con cubos de queso con recubrimiento.

Tanto en las muestras control como en las que poseen recubrimiento sin natamicina se comenzó a observar crecimiento de hongos al día 5. Para el ensayo con natamicina al 1 % se tomó como día de referencia el día 6, en el cual se puede observar desarrollo de hongos superficiales avanzado en las muestras sin natamicina y aún no en las que contenían natamicina. Para el ensayo con 0,1 % de natamicina, se tomó el día 5 como referencia ya que fue el único en el que se encontró desarrollo sólo en los quesos sin natamicina.

#### 4.5.4.1. Con natamicina al 1 % p/p en las formulaciones

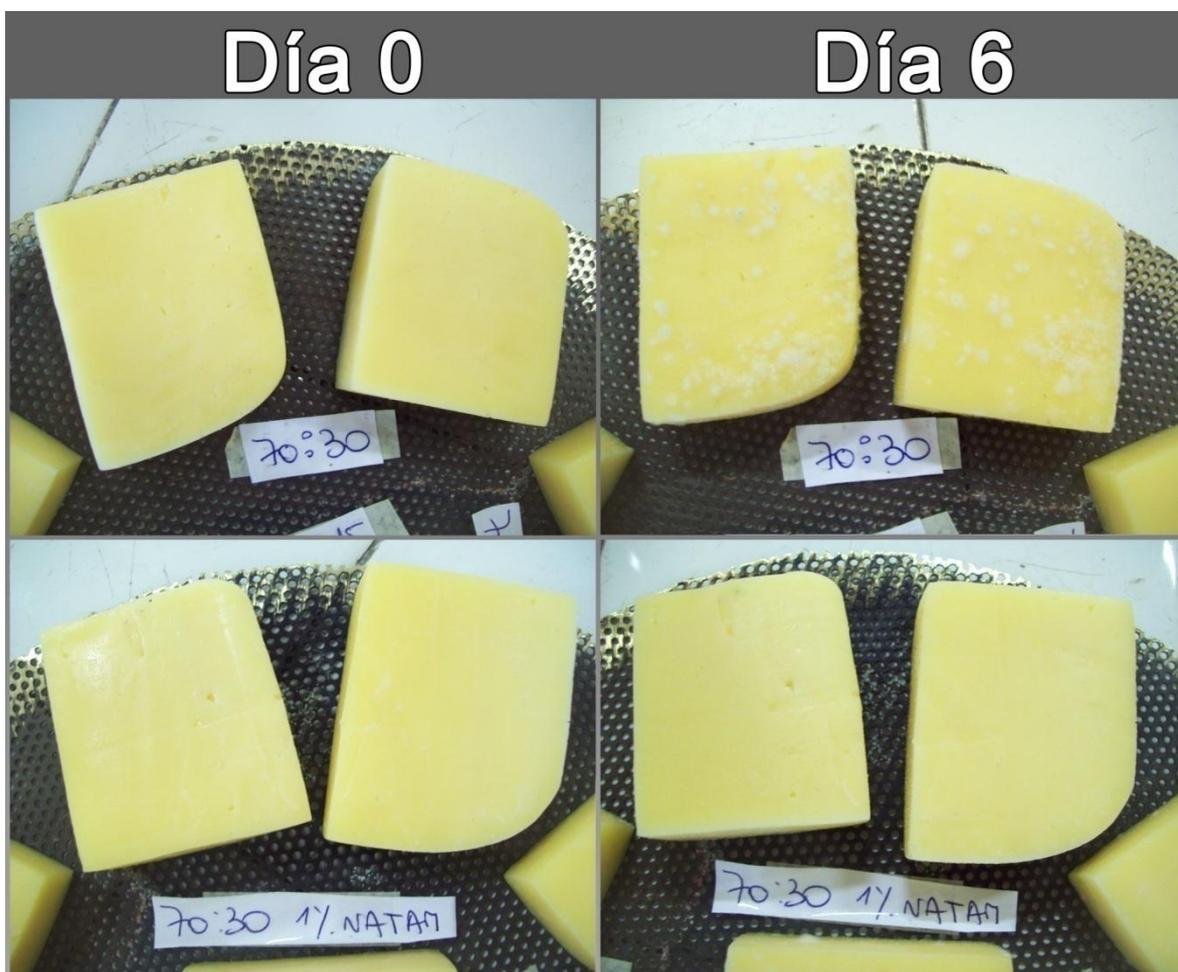
En las Figuras 4.25, 4.26 y 4.27 se muestran fotos de los cubos de queso sin recubrimiento, y con recubrimientos Alm/PVA 70:30, Alm/PVA 70:30 con 1 % de natamicina, Alm/PVA/PU 70:15:15, Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % de natamicina, Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU 70:25:5 con 1 % de natamicina, todas al día 0 (izquierda) y al día 6 del ensayo (derecha).



**Figura 4.25.** Quesos control sin recubrimiento y quesos con recubrimiento y Alm/PVA/PU 70:15:15 al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de seis días de almacenamiento (derecha).

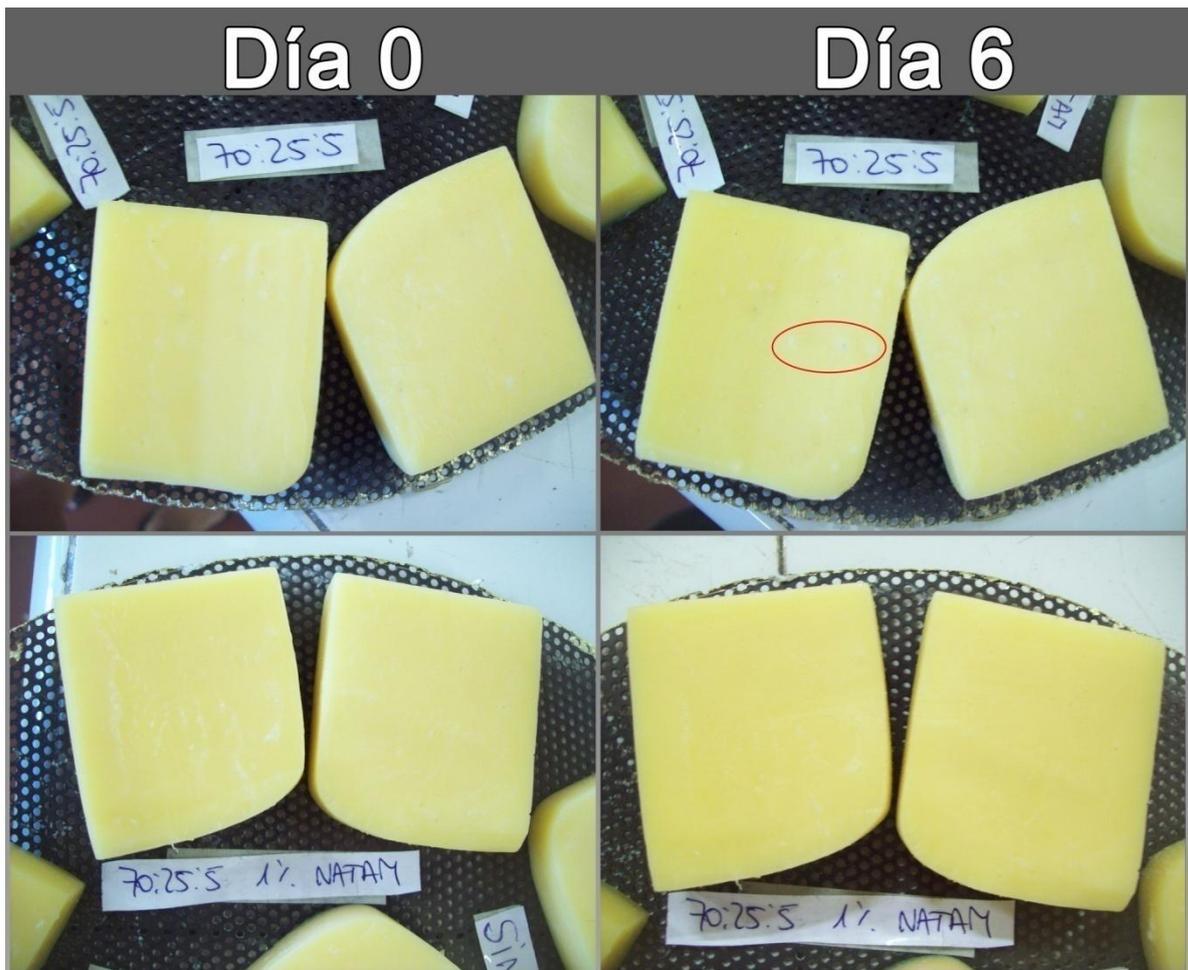
En la Figura 4.25 se muestran los resultados para los quesos control sin recubrimiento y para los quesos recubiertos con la formulación Alm/PVA/PU 70:15:15. Los quesos con recubrimiento de Alm/PVA/PU 70:15:15 mostraron un efecto antifúngico/fungistático, ya que el crecimiento fue menor que para los quesos recubiertos con formulación Alm/PVA 70:30 y que para el control sin recubrimiento; este efecto también fue evidente pero en menos medida para la formulación Alm/PVA/PU 70:25:5 (ver Figura 4.27). Es interesante remarcar que en este caso se pudo evidenciar un efecto antifúngico de la presencia de PU en las películas, a pesar de que en la sección 4.5.3.4 las películas control no mostraron un efecto antifúngico. Cuando se realiza un ensayo de desempeño frente a microorganismos la concentración utilizada es mucho mayor, lo que

seguramente impidió que se pudiera observar el efecto de la presencia de PU en ese ensayo.



**Figura 4.26.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA 70:30 con 1 % de natamicina al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de seis días de almacenamiento (derecha).

En la Figura 4.26 se puede observar que los quesos con recubrimiento de almidón y PVA 70:30 mostraron un mayor crecimiento de hongos en la superficie que aquellos quesos que no tenían recubrimiento (control “sin nada”). Esto puede deberse a que ambos componentes de la mezcla resultan sustratos propicios para los microorganismos. Cuando se adicionó natamicina al 1 % a esta formulación se evidenció el efecto antifúngico de la natamicina y al día 6 todavía no había crecimiento de hongos en la superficie. Este efecto se mantuvo hasta el día 8 de almacenamiento, mostrando además un desarrollo más lento de los hongos sobre la superficie de los quesos con el pasar de los días.



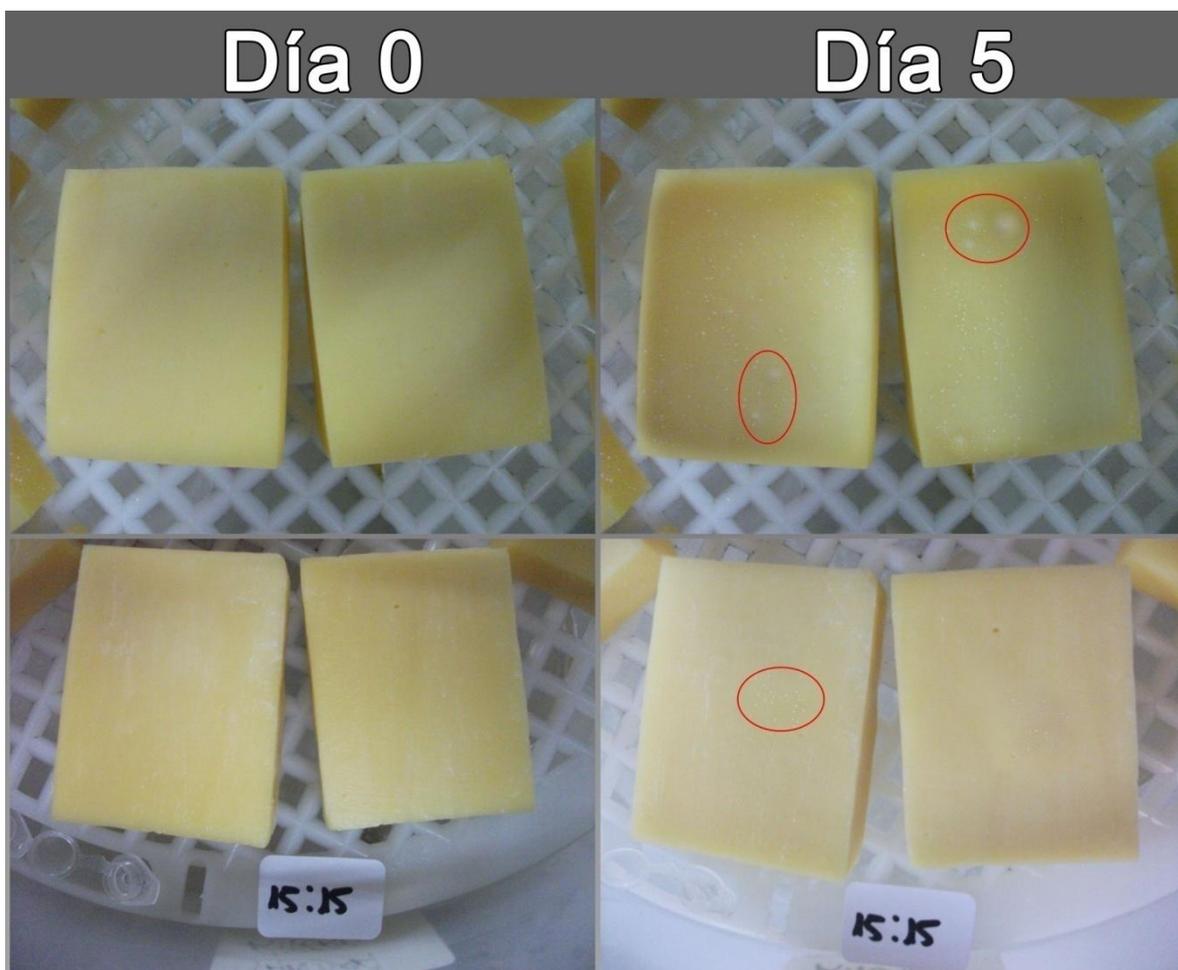
**Figura 4.27** Quesos con recubrimiento Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 1 % de natamicina al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de seis días de almacenamiento (derecha).

En la Figura 4.27 podemos ver que cuando se incorpora natamicina a la formulación Alm/PVA/PU 70:25:5, el efecto antifúngico es completo aún al día 6. En estos quesos con natamicina también se observó la aparición de hongos al día 8 de almacenamiento, y éstos fueron de desarrollo más lento. Por lo tanto, los recubrimientos con natamicina al 1% mostraron una mejora en el tiempo de conservación de aproximadamente un 60 %.

La discusión de estos resultados, junto con los obtenidos con recubrimientos conteniendo 0,1 % de natamicina se realizará en la sección siguiente luego de presentar los datos completos.

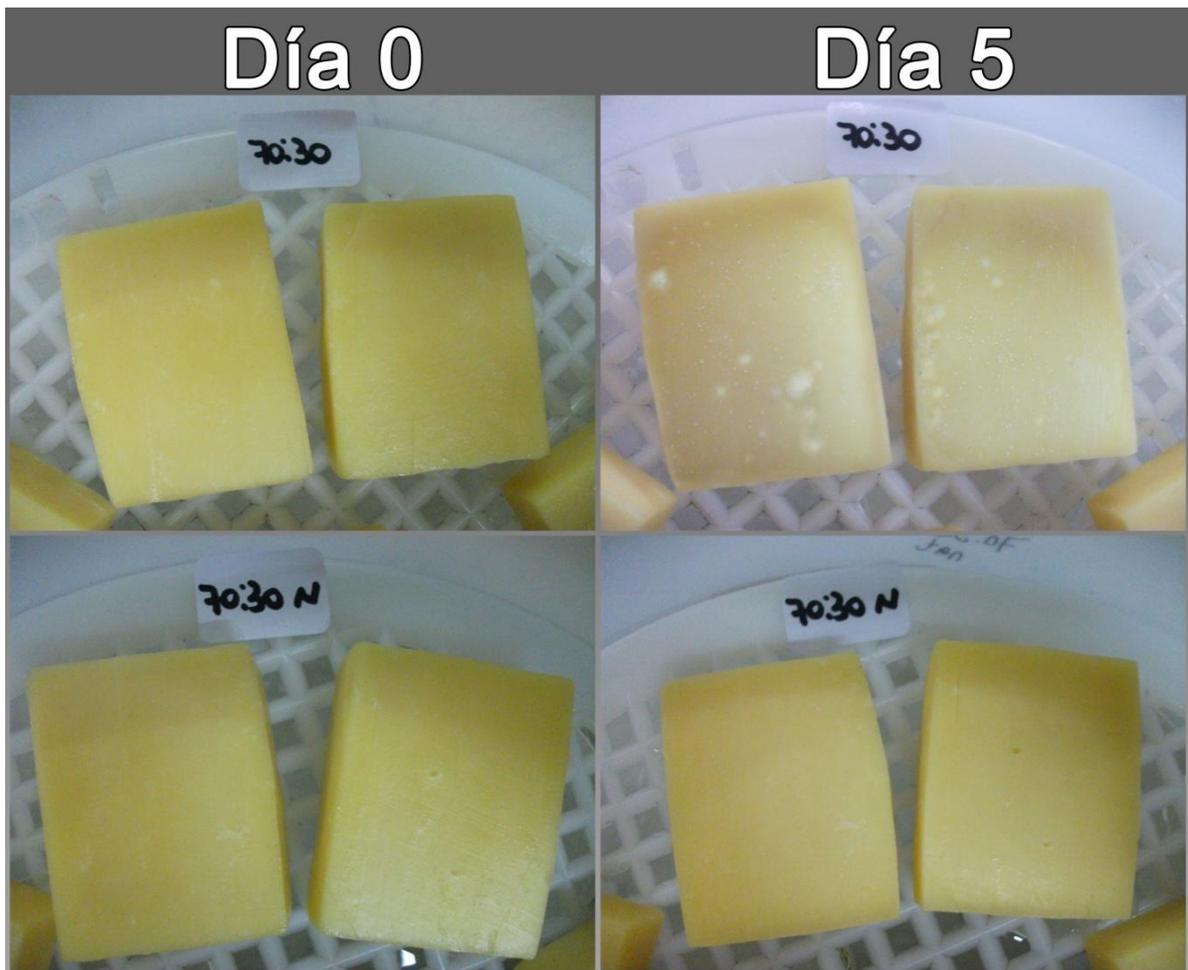
#### 4.5.4.2. Con natamicina al 0,1 % p/p en las formulaciones

En las Figuras 4.28, 4.29 y 4.30 se presentan los resultados obtenidos de forma similar a la utilizada en la sección anterior. La diferencia con el ensayo presentado en la sección 4.5.4.1 fue la utilización de una menor cantidad de natamicina en las formulaciones para cumplir con las especificaciones del CAA.



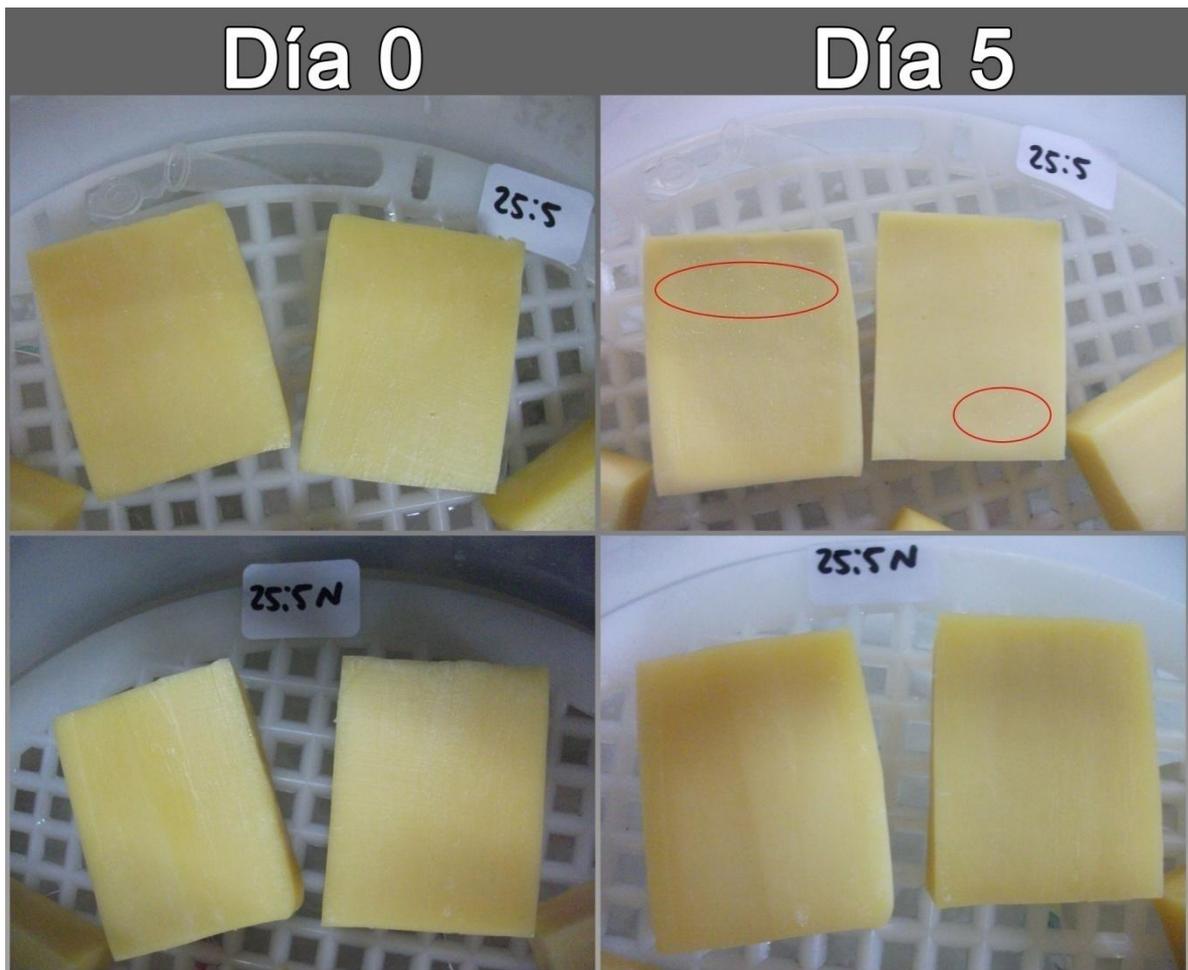
**Figura 4.28.** Quesos control sin recubrimiento y quesos con recubrimiento y Alm/PVA/PU 70:15:15 al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de cinco días de almacenamiento (derecha).

En este caso se observaron algunas similitudes con los ensayos con natamicina al 1 %: los quesos recubiertos con la formulación Alm/PVA/PU 70:30 presentaron mayor desarrollo de hongos en la superficie que aquellos sin recubrimiento (control); los recubrimientos que contenían PU mostraron un efecto fungicida/fungistático ya que el desarrollo fúngico en la superficie de los cubos recubiertos con estas formulaciones fue menor que para el control.



**Figura 4.29.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA 70:30 con 0,1 % de natamicina al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de cinco días de almacenamiento (derecha).

Los sistemas con natamicina (Figuras 4.29 y 4.30) retrasaron la aparición de hongos en la superficie de los quesos, aunque en este caso la mejora obtenida en el tiempo de conservación sin aparición de hongos en la superficie de los quesos fue de un 30 %. Considerando que la cantidad adicionada en este ensayo es 10 veces menor que la que se utilizó en la sección anterior, es importante destacar que la eficiencia de la natamicina como antifúngico no es una función lineal de su concentración. Por último, se observó que a esta concentración la natamicina también mostró un efecto de ralentización en el crecimiento de los hongos una vez comenzado su desarrollo.



**Figura 4.30.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 0,1 % de natamicina al comienzo del ensayo (izquierda) y luego de cinco días de almacenamiento (derecha).

#### 4.5.4.3. Discusión de resultados

Existen diversos métodos para aplicar natamicina en la conservación de quesos para evitar el crecimiento de hongos superficiales indeseables y/o potencialmente peligrosos. En la industria nacional una práctica común es rociar la superficie de los quesos con una solución de natamicina, esto lleva a que no exista control de la cantidad de compuesto activo por unidad de superficie, de la cantidad de natamicina que puede migrar hacia el interior del queso ni de la efectividad del tratamiento. Reys y col. (2002) estudiaron el uso de Delvo®Cid para proteger quesos semiduros frente al crecimiento de hongos superficiales por distintos métodos de aplicación: inmersión de queso en salmuera conteniendo natamicina, inmersión en suspensión acuosa de natamicina (antes o después de la salmuera), recubrir quesos con polivinil acetato conteniendo natamicina en

capas con y sin cera, envasar quesos con películas que fueron sumergidas en solución de natamicina y envasar quesos luego de la inmersión en solución de natamicina con bolsas al vacío. Los resultados mostraron que el contenido de natamicina se agota en el tiempo, y que esta pérdida depende de las condiciones de aplicación de la misma: el mayor tiempo de presencia de natamicina se obtuvo cuando se aplicaron 3 capas de polivinil acetato conteniendo natamicina y una capa de cera final. De Oliveira y col. (2007) demostraron, en concordancia con estos resultados, que el uso de un recubrimiento en capas conteniendo natamicina resulta en una menor cantidad de natamicina en la cáscara del queso que si se aplica la natamicina directamente en solución. La eficiencia de una película antimicrobiana depende, entonces, de la cantidad de natamicina liberada, de la calidad del contacto entre el queso y la película, de las propiedades de barrera de las películas y de las condiciones en la sala de maduración.

En bibliografía se puede encontrar una variedad de trabajos de conservación de quesos blandos, semiduros y duros con recubrimientos o películas activas (sintéticas o de fuentes naturales) conteniendo natamicina. En la mayoría de los casos se obtienen buenos resultados de conservación en función de los tiempo de maduración del tipo de queso propuesto (Var y col., 2006; de Oliveira y col., 2007; Fajardo y col., 2010; Hanušová y col., 2012; Yangilar y Yildiz, 2016).

En el caso del presente trabajo debe considerarse que los recubrimientos se evaluaron en condiciones de maduración de 80 % de humedad relativa y a 13 °C, conteniendo natamicina en una cantidad que logró inhibir el crecimiento de hongos en la superficie pero que mantuvo este efecto en un corto plazo. A pesar de que el método de aplicación en tres capas sucesivas conteniendo natamicina en su formulación parece ser adecuado para obtener los mejores resultados, es posible que el espesor final no sea el óptimo para poder lograr una conservación de los quesos en un plazo más extenso (cerca al tiempo de maduración correspondiente a un queso de estas características). Por otra parte, los ensayos se llevaron a cabo con porciones de queso con el objetivo de realizar un ensayo tentativo de la efectividad de los recubrimientos activos, pero para poder conocer la efectividad real en condiciones de maduración debería llevarse a cabo un ensayo con hormas de queso enteras, basándose en los resultados obtenidos en estas secciones.

## 4.6 Conclusiones Parciales

- Dada la no absorción de isooctano por parte de las películas Alm/PVA/PU, se concluye que el isooctano es adecuado como potencial simulante graso para evaluar el desempeño de las películas. Lamentablemente, la cuantificación de natamicina liberada hacia isooctano no se pudo concretar con las técnicas espectroscópicas disponibles.
- Las películas conteniendo 1 % de  $\alpha$ -tocoferol no ejercen efecto antioxidante; esto puede deberse a que el compuesto antioxidante no se libera de las películas, o bien a que, aunque se libere total o parcialmente, la cantidad empleada no es suficiente para lograr un efecto antioxidante significativo.
- Las películas aditivadas con BHT, tanto al 3 como al 5 %, no pueden ejercer su efecto antioxidante sobre el aceite de oliva extra virgen, ya que las moléculas de BHT están interaccionando fuertemente con la matriz polimérica, de forma tal que no pueden ser liberadas para ejercer su efecto antioxidante.
- El espesor promedio de los recubrimientos sobre queso fue de  $55 \pm 5$   $\mu\text{m}$ .
- Para las películas con natamicina, la presencia de natamicina en la cara sustrato es mayor que la cantidad presente en la cara aire para la formulación Alm/PVA 70:30, mientras que para las películas conteniendo PU la tendencia se invierte.
- En placas incubadas en frío se observó un enmohecimiento con *Penicillium spp* y también contaminación de mohos ambientales: *Alternaria sp*, *Cladosporium sp*, *Aspergillus Niger sp*, *Fusarium sp* y *Mucor sp*.
- Al estudiar la difusión de natamicina hacia la masa del queso cuando se lo recubrió con mezclas cargadas al 1 %, se encontró en todos los casos presencia del antifúngico. Por este motivo se decidió estudiar la eficacia de recubrimientos conteniendo natamicina al 0,1 %, cumpliendo con la condición del CAA de 1  $\text{mg}/\text{dm}^2$  de queso.
- Las películas cargadas con natamicina al 0,1 % muestran un efecto inhibitorio frente a *Penicillium spp* significativo. Este efecto es el mismo estadísticamente para todas las formulaciones de películas frente a las 3 cepas y menor al que muestran tanto la natamicina en solución en la misma concentración como el PU en dispersión. Las interacciones entre los componentes que conforman la película pueden hacer que la natamicina esté menos disponible para actuar en las películas activas.

- Los recubrimientos con natamicina al 1 % sobre queso mostraron una mejora en el tiempo de conservación de aproximadamente un 60 %, mientras que los que contenían 0,1 % mostraron una mejora del 30 %. La eficacia de la natamicina en función de su concentración no fue por lo tanto una función lineal.

## **5. CONCLUSIONES GENERALES**

- ❖ Se obtuvieron películas compuestas con un contenido mínimo de 70 % de almidón. El restante 30 % se completó con PVA o mezclas de PVA y PU en diferentes proporciones.
- ❖ Las películas compuestas conteniendo PU presentaron mejoras en sus propiedades mecánicas respecto a la película conformada por almidón y PVA.
- ❖ La incorporación de PU en las formulaciones, provocó una mejora en las propiedades de barrera.
- ❖ Cuando se adicionaron antioxidantes a las películas, se obtuvieron películas homogéneas con 1 % de  $\alpha$ -tocoferol y con 3 y 5 % de BHT. Cantidades mayores a 1 % de  $\alpha$ -tocoferol llevaron a una separación de fases del aditivo.
- ❖ Las características y propiedades de películas con natamicina no se vieron modificadas en forma sustancial, lo que permitió concluir que las formulaciones aditivadas con natamicina conforman un potencial recubrimiento activo con propiedades similares a las películas sin aditivar.
- ❖ Las películas cargadas con natamicina al 0,1 % mostraron un efecto inhibitorio significativo frente a diversas cepas de *Penicillium spp* aisladas de la superficie de quesos enmohecidos y frente a diversas cepas de mohos ambientales.
- ❖ Los recubrimientos con natamicina al 1 % sobre queso mostraron una mejora en el tiempo de conservación de aproximadamente un 60 %, mientras que los que contenían 0,1 % mostraron una mejora del 30 %. La eficacia de la natamicina en función de su concentración no es una función lineal.

## **6. TRABAJOS FUTUROS**

- ✓ Completar la caracterización con determinaciones de ángulo de contacto, permeabilidad al oxígeno y permeabilidad al dióxido de carbono.
- ✓ Estudiar si hay difusión de natamicina hacia la masa del queso cuando se recubre con formulaciones al 0,1 % de natamicina.
- ✓ Estudiar la liberación de natamicina desde la matriz de las películas.
- ✓ Ampliar ensayos con cepas de hongos de otros establecimientos/regiones.
- ✓ Realizar ensayos de eficiencia de películas aditivadas en hormas enteras de queso.
- ✓ Ensayar sistemas en capas con y sin antifúngico: primero dos capas sin natamicina y por último una capa final con natamicina más concentrada.
- ✓ Evaluar películas activas en otros tipos de quesos (enteros o procesados como queso en hebras) y/o en otros alimentos.
- ✓ Ensayar sistemas Alm/PU, en particular 90:10 y 85:15.
- ✓ Utilizar plastificantes poliméricos alternativos a poliuretano.
- ✓ Incorporar antifúngicos alternativos a la natamicina.
- ✓ Incorporar antioxidantes alternativos al BHT y  $\alpha$ -tocoferol.
- ✓ Llevar a cabo estudios de la biodegradabilidad del material polimérico.
- ✓ Realizar ensayos con películas aditivadas con porcentajes entre 0,1 y 0,5 % de aditivo.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AAM (1999). Food safety: current status and future needs. Washinton DC, American Academy of Microbiolog.
- Amalvy, J. I. (2002). "A kinetic study in emulsion polymerization of polyurethane-acrylate hybrids." Pigment & Resin Technology 31(5): 275-283.
- Anbinder, P. S. (2011). Caracterización, evaluación y aplicaciones de películas poliméricas activas. Departamento de Química. La Plata, Universidad Nacional de La Plata. Tesis Doctoral.
- Anbinder, S., P. J. Peruzzo y J. I. Amalvy (2016). "Effect of food additives on the microstructure, mechanical and water transport properties of polyurethane films." Progress in Organic Coating 101: 207-215.
- Araujo-Farroa, P. C., G. Podadera, P. J. A. Sobral y F. C. Menegalli (2010). "Development of films based on quinoa (Chenopodium quinoa, Willdenow) starch." Carbohydrate Polymers 81: 839-848.
- Arredondo, A., J. F. Patiño, M. E. Londoño y C. E. Echeverri (2011). "Matriz a partir de un hidrogel de alcohol polivinílico (pva) combinada con sulfadiazina de plata con potencial aplicacion en el manejo y control de la sepsis en heridas dérmicas." Revista Iberoamericana de Polímeros 12(4): 178-187.
- Arrieta, M. P., M. A. Peltzer, M. C. Garrigós Selva y A. Jiménez Migallón (2011). "Envases alimentarios sostenibles." Seguridad y Medio Ambiente: 46-56.
- Arvanitoyannis, I. y C. G. Biliaderis (1999). "Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch." Carbohydrate Polymers 38: 47-58.
- Arvanitoyannis, I., A. Nakayama y S. Aiba (1998). "Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatine and plasticized by polyols and water." Carbohydrate Polymers 36: 105-109.
- ASTM (1994). Annual Book of ASTM Standards. Standard Test Methods for Moisture Content of Paper and Paperboard by Oven Drying. Philadelphia, American Society for Testing Materials. ASTM D644-94: 1-2.
- ASTM (1996). Annual Book of ASTM Standards. Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM D882-91.
- Athar, A. y H. Winner (1971). "Development of resistance by Candida species to polyene antibiotics in vitro." Journal of Med Microbiology 4: 505-517.
- Atta, H. M., S. M. Selim y M. S. Zayed (2012). "Natamycin Antibiotic Produced By Streptomyces sp.: Fermentation, Purification and Biological Activities." Journal of American Science 8(2): 469-475.
- Barrera, J. E., J. A. Rodríguez, J. E. Perilla y N. A. Algecira (2007). "Estudio de la degradación térmica de poli (alcohol vinílico) mediante termogravimetría y termogravimetría diferencial." Ingeniería e Investigación 27(2): 100-105.

- Basílico, J. C., M. Z. de Basílico, C. Chiericatti y C. G. Vinderola (2001). "Characterization and control of thread mould in cheese." Letters in Applied Microbiology 32: 419-423.
- Bastarrachea, L., S. Dhawan y S. S. Sablani (2011). "Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: a review." Food Engineering Reviews 3(1): 79-93.
- Belitz, H. D. y W. Grosch (1997). Cereales y Derivados. Química de los Alimentos. H. D. Belitz and W. Grosch. Zaragoza, Acibia.
- Bello-Pérez, L. A. (1995). Amilopectina-Characterización molecular y funcional. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Guanajuato, México. Tesis Doctoral.
- Benmerad, M. F., S. Djadoun, Z. A. Alothman y T. Aouak (2011). "Miscibility study of poly(vinyl chloride)/poly(methyl methacrylate-co-4-vinylpyridine) by viscosimetry, DSC, and FTIR." Journal of Applied Polymer Science. 119: 173-182.
- Beresford, T., N. Fitzsimons, N. Brennan y T. Cogan (2001). "Recent advances in cheese microbiology." International Dairy Journal 11: 259-274.
- Bertola, N. (1982). Vinculación entre modificaciones texturales y microestructura durante la maduración de quesos en películas plásticas. Facultad de Ingeniería. La Plata, UNLP. Tesis Doctoral.
- Bertuzzi, M. A., E. F. Castro Vidaurre, M. Armada y J. C. Gottifredi (2007). "Water vapor permeability of edible starch based films." Journal of Food Engineering 80(3): 972-978.
- Białecka-Florjan, E. y Z. Florjan (2007). Solubility of Plasticizers, Polymers and Environmental Pollution. New York.
- Bierhalz, A. C. K., M. A. da Silva y T. G. Kieckbusch (2012). "Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications." Journal of Food Engineering 110: 18-25.
- Bierhalz, A. C. K., M. A. da Silva, H. C. de Sousa, M. E. M. Braga y T. G. Kieckbusch (2013). "Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films." The Journal of Supercritical Fluids 76: 74-82.
- Bohlmann, G. M. (2005). General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers. Handbook of biodegradable polymers. Inglaterra, Smithers: 183-217.
- Breese, K., J. Lamèthe y C. DeArmitt (2000). "Improving synthetic hindered phenol antioxidants: learning from vitamin E." Polymer Degradation and Stability 70(1): 89-96.
- Briassoulis, D. (2004). "An overview on the mechanical behaviour of biodegradable agricultural films." Journal of Polymers and the Environment. 12(2): 65-81.

- Brik, H. (1981). Natamycin. Analytical Profile of Drug Substances. K. e. a. Florey. London, Academic Press. 10: 513-561.
- Bulleman, L. B. (1981). "Public Health Significance of Molds and Mycotoxins in Fermented Dairy Products." Journal of Dairy Science 64: 2439-2452.
- CAA (2014a). Alimentos Lácteos. Código Alimentario Argentino. ANMAT: Art. 553 a 642.
- CAA (2014b). Aditivos Alimentarios. Código Alimentario Argentino. ANMAT. XVIII: Art. 1391 a 1406.
- Cao, N., X. Yang y Y. Fu (2009). "Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films." Food Hydrocolloids 23(3): 729-735.
- Capitan Vallvey, L. (2000). "Rapid Ultraviolet Spectrophotometric and Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Natamycin in Lactoserum Matrix." Journal of AOAC International 83(4): 802-808.
- Capron, I., P. Robert, P. Colonna, M. Brogly y V. Planchot (2007). "Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy." Carbohydrate Polymers 68: 249-259.
- Casarrubias-Castillo, M. G., G. Méndez-Montealvo, S. L. Rodríguez-Ambriz, M. M. Sánchez-Rivera y L. A. Bello-Pérez (2012). "Diferencias estructurales y reológicas entre almidones de frutas y cereales." Agrociencia 46: 455-466.
- Catalá, R. y R. Gavara (2002). Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. Valencia, CSIC.
- Cayelac. (2016). "Queso Tybo." Ingreso 25-07, 2016, de [www.cayelac.com.ar](http://www.cayelac.com.ar).
- Cé, N., C. P. Z. Noreña y A. Brandelli (2012). "Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin." CyTA - Journal of Food 10: 21-26.
- Cha, D. S. y M. S. Chinnan (2004). "Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review". Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44 (4)(4): 223-237.
- Chiellini, E., P. Cinelli, E. Grillo Fernandes, E.-R. S. Kenawy y A. Lazzeri (2001b). "Gelatin-Based Blends and Composites. Morphological and Thermal Mechanical Characterization." Biomacromolecules 2: 806-811.
- Cinelli, P., E. Chiellini, J. W. Lawton y S. H. Imam (2006). "Foamed articles based on potato starch, corn fibers and poly(vinyl alcohol)." Polym. Degrad. and Stab. 91: 1147-1155.
- Coker, R. D. (1997). Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. NRI Bulletin 73. N. R. Institute. Chatham, Reino Unido.
- Corbo, M. R., B. Speranza, A. Filippone, S. Granatiero, A. Conte, M. Sinigaglia y M. Del Nobile (2008). "Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger." International Journal of Food Microbiology 127(3): 261-267.

- Corbo, M., A. Bevilacqua, D. Campaniello, D. D'Amato, B. Speranza y M. Sinigaglia (2009). "Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review." International Journal of Food Science & Technology 44(2).
- Cruz-Romero, M. y J. P. Kerry (2008). "Crop-based biodegradable packaging and its environmental implications." CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3: 1-25.
- da Silva, M. A., A. C. K. Bierhalz y T. G. Kieckbusch (2011). Physical-chemical properties of alginate/chitosan composite films containing natamycin as antimicrobial agent. Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). Athens, Greece: 6.
- Dangaran, K., P. M. Tomasula y P. Qi (2009). Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. K. C. Huber and M. Embuscado. New York, Springer: 25-56.
- Davis, G. y J. H. Song (2006). "Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management." Industrial Crops and Products 23: 147-161.
- De Boer, E. y M. Stolk-Horsthuis (1977). "Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses." Journal of Food Protection 40: 533-536.
- de Oliveira, T. M., N. de Fátima Ferreira Soares, R. M. Pereira y K. de Freitas Fraga (2007). "Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation." Packaging Technology and Science 20: 147-153.
- de Ruig, W. G., J. J. van Oostrom y K. Leenheer (1987). "Spectrometric and Liquid Chromatographic Determination of Natamycin in Cheese and Cheese Rind." Journal - Association of Official Analytical Chemists 70: 944-948.
- Dean, K. M., M. D. Do, E. Petinakis y L. Yu (2008). "Key interactions in biodegradable thermoplastic starch/poly(vinyl alcohol)/montmorillonite micro- and nanocomposites." Composites Science and Technology. 68: 1453-1462.
- Del Nobile, M. A., D. Gammariello, A. Conte y M. Attanasio (2009). "A combination of chitosan, coating and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di latte cheese shelf life." Carbohydrate Polymers 78: 151-156.
- Del Nobile, M. A., S. Chillo, A. Mentana y A. Baiano (2007). "Use of the generalized Maxwell model for describing the stress relaxation behavior of solid-like foods." Journal of Food Engineering 78: 978-983.
- Dong, A., J. Xie, Q. Liu, D. Li y P. Hu (2013). "Rheological and Thermal Behavior of PVAc/Starch Blends Modified by Acrylic Acid." Polymer Engineering and Science 54: 2449-2454.
- Dopico-García, M. S., J. M. López-Vilariño y M. V. González-Rodríguez (2003). "Determination of antioxidant migration levels from low-density polyethylene films into food simulants." Journal of Chromatography A 1018: 53-62.

- dos Santos Pires, A. C., N. F. F. Soares, R. M. Pereira, N. J. Andrade, L. H. M. Silva, G. P. Camilloto y P. C. Bernardes (2008). "Development and evaluation of active packaging for sliced mozzarella preservation." Packaging Technology and Science 21(7): 375-383.
- El-Diasty, E., R. El-Kaseh y R. Salem (2008). "The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt." Arab Journal of Biotechnology 12(1): 41-48.
- European-Bioplastics. (2012). "What are bioplastics?" Ingreso 23-07-16, de <http://en.european-bioplastics.org>.
- Fajardo, P., J. T. Martins, C. Fuciños, L. Pastrana, J. A. Teixeira y A. A. Vicente (2010). "Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese." Journal of Food Engineering 101: 349-356.
- Famá, L., A. M. Rojas, S. Goyanes y L. Gerschenson (2005). "Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates." LWT-Food Science and Technology 38(6): 631-639.
- Famá, L., S. Flores, L. Gerschenson y S. Goyanes (2006). "Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures." Carbohydrate Polymers 66: 8-15.
- Famá, L., S. Goyanes y L. Gerschenson (2007). "Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films." Carbohydrate Polymers 70: 265-273.
- Fanelli, B. (2009). "Almidón." Ingreso 15-07-16, de <http://myslide.es/documents/02-almidon.html>.
- FAO (2003). Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. Roma, FAO.
- Ferrero, C., M. N. Martino y N. E. Zaritzky (1996). "Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC." Journal of Thermal Analysis 47: 1247-1266.
- Flores, S. K., D. Costa, F. Yamashita, L. N. Gerschenson y G. M. V. (2010). "Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. ." Materials Science and Engineering 30(1): 196-202.
- Flores, S., L. Fama, A. M. Rojas, S. Goyanes y L. Gerschenson (2007). "Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate." Food Research International 40: 257-265.
- Frost, K., D. Kaminski, G. Kirwan, E. Lascaris y R. Shanks (2009). "Crystallinity and structure of starch using wide angle X-ray scattering." Carbohydrate Polymers 78: 543-548.

- Gallo, L. y R. Jagus (2006). "Modelling *Saccharomyces cerevisiae* inactivation by natamycin in liquid cheese whey." Brazilian Journal of Food Technology 9(4): 311-316.
- García, M. A., A. Pinotti, M. N. Martino y N. E. Zaritzky (2009). Charact. starch composite edible films coat. Edible Films and Coatings for Food Applications. M. E. Embuscado and K. C. Huber, Springer: 169 – 209.
- García, M. A., M. N. Martino y N. E. Zaritzky (1998). "Plasticized Starch-Based Coatings To Improve Strawberry (*Fragaria* × *Ananassa*) Quality and Stability." Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(9): 3758-3767.
- García, M. A., M. N. Martino y N. E. Zaritzky (1999). "Edible starch films and coatings characterization: scanning electron microscopy, water vapor transmission and gas permeabilities." Scanning 21(5): 348-353.
- García, M. A., M. N. Martino y N. E. Zaritzky (2000). "Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films." Starch 52: 118-124.
- Ghanbarzadeh, B., H. Almasi y A. A. Entezami (2010). "Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethylcellulose." Industrial Crops and Products 33(1): 229-235.
- Ghannoum, M. y L. Rice (1999). "Antifungal agents : mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance." Clinical Microbiology 12: 501-517.
- Ghasemlou, M., F. Khodaiyan, A. Oromiehie y M. S. Yarmand (2011). "Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains." Food Chemistry 127: 1496-1502.
- Greener, I. y O. Fennema (1993). "The effects of plasticizers on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films." Journal of Food Processing and Preservation 17(4): 247-257.
- Guerra-Della Valle, D., L. A. Bello-Pérez, R. A. González-Soto, J. Solorza-Feria y G. Arámbula-Villa (2008). "Efecto del tiempo de reacción en la acetilación de almidón de plátano." Revista Mexicana de Ingeniería Química 7(3): 283-291.
- Gurgel Adeodato Vieira, M., M. Altenhofen da Silva, L. Oliveira dos Santos y M. Masumi Beppu (2011). "Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review." European Polymer Journal 47: 254-263.
- Hammond, S. y P. Lambert (1978). Membrane-active antimicrobial agents. Antibiotics and Antimicrobial Action. Londres, Edward Arnold Publishers Limited.
- Han, F., M. Liu, H. Gong, S. Lü, B. Ni y B. Zhang (2012). "Synthesis, characterization and functional properties of low substituted acetylated corn starch." International Journal of Biological Macromolecules 50: 1026-1034.
- Han, J. H. (2000). "Antimicrobial Food Packaging." Food Technology 54(3): 56-65.

- Hanušová, K., J. Dobiáš y M. Voldrich (2012). "Assessment of functional properties and antimicrobial efficiency of polymer films with lacquer layer containing natamycin in cheese packaging." Journal of Food And Nutrition Research 51(3): 145-155.
- Hanušová, K., M. Štastná, L. Votavová, K. Klaudivová, J. Dobiáš, M. Voldrich y M. Marek (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(491-496).
- Harrick, N. J. (1967). Internal reflection spectroscopy. New York, London and Sidney, Interscience Publishers.
- Hernández Silva, M. L. y B. Guzmán Martínez (2009). "Biopolymers used in the manufacture of food packaging." Revista Publicaciones e Investigación, Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales 3: 103-122.
- Hocking, A. D. (1997). Understanding and controlling mould spoilage in cheese. Issues in Cheese Microbiology. Werribee, Australia. 52: 123-124.
- Hourston, D. J. y M. Mo Song (2006). Applications of modulated temperature differential scanning calorimetry to polymer blends and related systems. Applications of Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry: 161-215.
- Huang, D. P. y L. W. Rooney (2001). Starches for Snack Foods. Snacks Food Processing. E. W. Lusas and L. W. Rooney. Florida, CRC Press.
- Hymery, N., V. Vasseur, M. Coton, J. Mounier, J.-L. Jany, G. Barbier y E. Coton (2014). "Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13: 437-456.
- Icoz, D. Z. y J. L. Kokini (2007). "Probing the boundaries of miscibility in model carbohydrates consisting of chemically derivatized dextrans using DSC and FTIR spectroscopy." Carbohydrate Polymers 68: 68-76.
- Ilcin, M., O. Hola, B. Bakajova y J. Kucerik (2010). "FT-IR study of gamma-radiation induced degradation of polyvinyl alcohol (PVA) and PVA/humic acids blends." Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 283(1): 9-13.
- Irlinger, F. y J. Mounier (2009). "Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety." Current Opinion in Biotechnology 20(2): 142-148.
- ISO (2013a). Cheese, cheese rind and processed cheese - Determination of natamycin content. Part 1: Molecular absorption spectrometric method for cheese rind. Geneva, International Organization for Standardization. ISO 9233-1.
- ISO (2013b). Cheese, cheese rind and processed cheese - Determination of natamycin content. Part 2: High - Performance Liquid Chromatographic method for cheese, cheese rind and processed cheese. Geneva, International Organization for Standardization. ISO 9233-2.

- Jayasekara, R., I. Harding, I. Bowater, G. B. Y. Christie y G. T. Lonergan (2004). "Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films." Polymer testing 23: 17-27.
- Jia, Y. T., J. Jian Gong, X. H. Gu, H. Y. Kim, J. Dong y X. Y. Shen (2007). "Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanoWbers produced by electrospinning method." Carbohydrate Polymers 67: 403-409.
- Jin, H., J. McCaffery y E. Grote (2008). "Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast." The Journal of Cell Biology 180(4): 813-826.
- Karagoz, S. y G. Ozkoc (2013). "Effects of a Diisocyanate Compatibilizer on the Properties of Citric Acid Modified Thermoplastic Starch/Poly(lactic acid) Blends." Polymer Engineering and Science 53: 2183-2193.
- Karam, L. B., C. Ferrero, M. N. Martino, N. E. Zaritzky y M. V. E. Grossmann (2006). "Thermal, microstructural and textural characterisation of gelatinised corn, cassava and yam starch blends." International Journal of Food Science and Technology 41(7): 805-812.
- Karam, L. B., M. V. E. Grossmann, S. R. S., C. Ferrero y N. E. Zaritzky (2005). "Gel textural characteristics of corn, cassava and yam starch blends: A mixture surface response methodology approach." Starch 57(2): 62-70.
- Kaseem, M., K. Hamad y F. Deri (2012). "Thermoplastic Starch Blends: A Review of Recent Works." Polymer Science 54(2): 165–176.
- Katan, L. (1996). Migration from Food Contact Materials. Londres, Springer.
- Katz, F. R., S. L. Furcsik, F. L. Tenbarger, R. J. Hauber y R. B. Friedman (1993). "Behavior of starches derived from varieties of maize containing different genetic mutations: effect of starch type on granular morphology." Carbohydrate Polymers 21: 133-136.
- Khan, M. A., S. K. Bhattacharia, M. A. Kader y K. Bahari (2006). "Preparation and characterization of ultra violet (UV) radiation cured bio-degradable films of sago starch/PVA blend." Carbohydrate Polymers 63: 500-506.
- Kivanç, M. (1990). "Mold growth and presence of aflatoxin in some turkish cheeses." Journal of Food Safety 10: 287-294.
- Kizil, R., J. Irudayaraj y K. Seetharaman (2002). "Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy." Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 3912-3918.
- Klose, C., C. Ejsing, A. García-Sáez, H. Kaiser, J. Sampaio, M. Surma y K. Simons (2010). "Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains." The Journal of Biological Chemistry 285(39): 30224-30232.
- Koontz, J. L., J. E. Marcy, W. E. Barbeau y S. E. Duncan (2003). "Stability of Natamycin and Its Cyclodextrin Inclusion Complexes in Aqueous Solution." Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 7111-7114.

- Lau, O.-H. y S. Wong (2000). "Contamination in food from packaging material." Journal of Chromatography A 882: 255-270.
- Leistner, L. y J. I. Pitt (1977). Miscellaneous Penicillium toxins. Mycotoxins in human and animal health. J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine and M. A. Mehlman. Forest South, Pathotox.
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starches. Innovations in food packaging. J. H. Han. Amsterdam, Elsevier.
- López, O. V., C. J. Lecot, N. E. Zaritzky y M. A. García (2011). "Biodegradable packages development from starch based heat sealable films." Journal of Food Engineering 105(2): 254-263.
- López, O. V., S. Z. Viña, N. A. Pachas, M. N. Sisterna, P. H. Rohatsch, A. Mugridge, H. E. Fassola y M. A. García (2010). "Composition and food properties of Pachyrhizus ahipa roots and starch." International Journal of Food Science and Technology 45: 223-233.
- López, O., M. García y N. Zaritzky (2008). "Film forming capacity of chemically modified corn starches." Carbohydrate Polymers 73: 573-581.
- Lourdin, D., H. Bizot y P. Colonna (1997). "Antiplasticization in starch glycerol films?" Journal of Applied Polymer Science 63: 1047-1053.
- Lu, Y., L. Tighzert, F. Berzin y S. Rondot (2005). "Innovative plasticized starch films modified with waterborne polyurethane from renewable resources." Carbohydrate Polymers 61: 174-182.
- Lund, F., A. Nielsen y P. Skouboe (2003). "Distribution of Penicillium commune isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting." Food Microbiology 20(6): 725-734.
- Lund, F., O. Filtenborg y J. C. Frisvad (1995). "Associated mycoflora of cheese." Food Microbiology 12: 173-180.
- Luo, X., J. Li y X. Lin (2012). "Effect of gelatinization and additives on morphology and thermal behavior of corn starch/PVA blend films." Carbohydrate Polymers 90: 1595– 1600.
- Mali, S., L. B. Karam, L. Pereira Ramos y M. V. E. Grossmann (2004). "Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films." Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7720-7725.
- Mali, S., L. S. Sakanaka, F. Yamashita y M. Grossmann (2005). "Water Sorption and Mechanical Properties of Cassava Starch Films and their Relation to Plasticizing Effect." Carbohydrate Polymers 60: 283-289.
- Mali, S., M. Grossmann, M. García, M. Martino y N. Zaritzky (2002). "Microstructural characterization of yam starch films." Carbohydrate Polymers 50: 379-386.

- Mallapragada, S. K. y N. A. Peppas (1996). "Dissolution mechanism of semicrystalline poly(vinyl alcohol) in water." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 34: 13397.
- Mancini, M., M. Moresi y R. Rancini (1999). "Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation." Journal of Food Engineering 39: 369-378.
- Marsh, K. y B. Bugusu (2007). "Food packaging-roles, materials, and environmental issues." Journal of Food Science 72: R39-R55.
- Mayer, C. F. M. S. (1953). "Endemic panmyelotoxicoses in the russian grain belt. Part One: The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA), a comprehensive review." The Mllitary Surgeon 113: 173-189.
- Meincken, M., A. Klash, S. Seboa y R. Sanderson (2006). " Influence of the viscosity and the substrate on the surface hydrophobicity of polyurethane coatings." Applied Surface Science 253: 805-809.
- Moatsou, G., E. Moschopoulou, A. Beka, P. Tsermoula y D. Pratsis (2015). "Effect of natamycin-containing coating on the evolution of biochemical and microbiological parameters during the ripening and storage of ovine hard-Gruyere-type cheese." International Dairy Journal 50: 1-8.
- Moneam, Y. K. A., H. A. A. Sakr, H. E. Ali, S. A. Khalil y A. W. M. El-Naggar (2014). "Characterization and Antimicrobial Properties of Gamma Synthesized Plasticized Starch/Poly(vinyl alcohol)/ZnO Composites as Protective Coating for papers." International Journal of ChemTech Reserach 6(4): 2583-2597
- Moreno, R. (1992). "The role of slip additives in tape casting technology. II: Binders and plasticizers." Journal of American Ceramic Society Bulletin 71(11): 1647–1657.
- Navarra, G., M. Cannas, M. D'Amico, D. Giacomazza, V. Militello, L. Vaccaro y M. Leone (2011). "Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence." Food Chemistry 126: 1226-1231.
- Nerin, C. (2002). Migración en poliolefinas. Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. I. d. A. y. T. d. Alimentos. Valencia, CSIC.
- Ollé Resa, C. P., L. N. Gerschenson y R. J. Jagus (2013). "Effect of Natamycin on Physical Properties of Starch Edible Films and Their Effect on *Saccharomyces cerevisiae* Activity." Food Bioprocess Technology 6(11): 3124-3133.
- Pardini, F., P. Faccia y J. Amalvy (2015). "Evaluation of pH-sensitive polyurethane/2-diethylaminoethyl methacrylate hybrids potentially useful for drug delivery developments." Journal of Drug Delivery Science 30A: 199-208.
- Pardini, O. R. y J. I. Amalvy (2008). "FTIR, 1H-NMR spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids." J. Appl. Polym. Sci. 107: 1207-1214.

- Pedersen, G. A., L. K. Jensen, A. Fankhauser, S. Biedermann, J. H. Petersen y B. Fabech (2008). "Migration of epoxidized soybean oil (ESBO) and phthalates from twist closures into food and enforcement of the overall migration limit." Food Additives and Contaminants 25(4): 503-510.
- Peppas, N. A. y E. W. Merrill (1977). "Development of Semicrystalline Poly (vinyl Alcohol) Hydrogels for Biomedical Applications." Journal of Biomedical Materials Research 11: 423-434.
- Peruzzo, P. J., P. S. Anbinder, O. R. Pardini, C. A. Costa, C. A. Leite, F. Galembeck y J. I. Amalvy (2010). "Polyurethane/Acrylate Hybrids: Effects of the Acrylic Content and Thermal Treatment on the Polymer Properties." Journal of Applied Polymer Science 116: 2694–2705.
- Peruzzo, P. J., S. Anbinder, O. R. Pardini, J. Vega, C. A. Costa, F. Galembeck y J. I. Amalvy (2011). "Waterborne polyurethane/acrylate: Comparison of hybrid and blend systems." Progress in Organic Coating 72: 429-437.
- Petersen, K., P. V. Nielsen, G. Bertelsen, M. Lawther, M. B. Olsen, N. H. Nilsson y G. Mortensen (1999). "Potential of biobased materials for food packaging." Trends in Food Science and Technology 10: 52-68.
- Pitt, J. I. (1991). A Laboratory Guide to common Penicillium species, Commonwealth scientific and industrial research organization. Division of food processing.
- Pranoto, Y., S. K. Rakshit y V. M. Salokhe (2005). "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin." LWT - Food Science and Technology 38: 859-865.
- Ran, X., P. Deng, Y. Zhuang, L. Dong, G. Gao, C. Zhao y F. Liu (2003). "Characterization of Full-Biodegradable Starch-PVA-Polyester Film." Chemical Research in Chinese Universities 19(2): 249-252.
- Reps, A., L. J. Drychowski, J. Tomasik y K. Winiewska (2002). "Natamycin in ripening cheeses." Pakistan Journal of Nutrition 1: 243-247.
- Robinson, R. K. (1990). Dairy microbiology Vol. 2: The microbiology of milk products. London, Elsevier Applied Science.
- Rohman, A. y Y. B. Che Man (2013). "Application of FTIR Spectroscopy for Monitoring the Stabilities of Selected Vegetable Oils During Thermal Oxidation." International Journal of Food Properties 16: 1594-1603.
- Romero-Bastida, C. A., L. A. Bello-Pérez, M. A. García, M. N. Martino, J. Solorza-Feria y N. E. Zaritzky (2005). " Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches." Carbohydrate Polymers 60(2): 235-244.
- Rosen, S. L. (1982). Fundamental principles of polymeric materials New York, Wiley.
- Ruban, S. W. (2009). "Biobased Packaging - Application in Meat Industry." Veterinary World 2: 79-82.

- Sabatier, J. (2005). "Entrecruzamiento de un almidón comercial utilizando epiclorhidrina y trimetafosfato de sodio." Revista Peruana de Química e Ingeniería Química 8(1): 16-23.
- Santayanan, R. y J. Wootthikanokkhan (2003). "Modification of cassava starch by using propionic anhydride and properties of the starch-blend polyester polyurethane." Carbohydrate Polymers 51: 1724.
- Saxena, S. K. (2004). Polyvinyl Alcohol (PVA) - Chemical and Technical Assessment. FAO 61st JECFA. Rome, Italy, FAO. 61: 3-7.
- Sejidov, F., Y. Mansoori y N. Goodarzi (2005). "Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 240: 186-190.
- Sengun, I. Y., D. B. Yaman y S. A. Gonul (2008). "Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review." World Mycotoxin Journal 1(3): 291-298.
- Shogren, R. L., G. F. Fanta y W. M. Doane (1993). "Development of starch based plastics - A reexamination of selected polymer systems in historical perspective." Starch 45: 276-280.
- Sin, L. T., W. A. W. A. Rahman, A. R. Rahmat y M. I. Khan (2010). "Detection of synergistic interactions of polyvinyl alcohol-cassava starch blends through DSC." Carbohydrate Polymers 79: 224-226.
- Sin, L. T., W. A. W. A. Rahman, A. R. Rahmat y M. Mokhtar (2011). "Determination of thermal stability and activation energy of polyvinyl alcohol-cassava starch blends." Carbohydrate Polymers 83: 303-305.
- Sinha-Ray, S. y M. Bousmina (2005). "Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world." Progress in Materials Science 50: 962-1080.
- Sinigaglia, M., A. Bevilacqua, M. R. Corbo, S. Pati y M. A. Del Nobile (2008). "Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese." International Dairy Journal 18: 624-630.
- Siracusa, V., P. Rocculi, S. Romani y M. D. Rosa (2008). "Biodegradable polymers for food packaging: a review." Trends in Food Science & Technology 19: 634-643.
- Song, F., D.-L. Tang, X.-L. Wang y Y.-Z. Wang (2011). "Biodegradable soy protein isolate-based materials: A review." Biomacromolecules 12: 3369-3380.
- Song, Y. y Q. Zheng (2014). "Ecomaterials based on food proteins and polysaccharides." Polymer Reviews 54: 514-571.
- Sorrentino, A., G. Gorrasi y V. Vittoria (2007). "Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications." Trends in Food Science & Technology 18: 84-95.

- Spychaj, T., K. Wilpiszewska y S. Sychaj (2007). Starch-urethane polymers: physicochemical aspects, properties, application. . Handbook of Engineering Biopolymers: Homopolymer Blends and Composites. D. Bhattacharyya: 155-165.
- Sreekumar, A., M. A. Al-Harhi y S. K. De (2012). "Studies on Compatibility of Biodegradable Starch/Polyvinyl Alcohol Blends." Polymer Engineering and Science. 52: 2167- 2172.
- Sudhamani, S. R., M. S. Prasad y K. Udaya Sankar (2003). "DSC and FTIR studies on Gellan and Polyvinyl alcohol (PVA) blend films." Food Hydrocolloids 17 245–250.
- Sun, X. (2005a). Overview of plant polyers: resources, demands and sustainability. Bio-Based Polymers and Composites. R. Wool and X. Sun, Elsevier Academic Press: 1-14.
- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney y S. Shah (2007). "Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. A review." Biotechnology Advances 25: 148-175.
- Te Welscher, Y., H. Ten Napel, M. Balagué, C. Souza, H. Riezman, B. De Kruijff y E. Breukink (2008). "Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane." The Journal of Biological Chemistry 283(10): 6393-6401.
- Te Welscher, Y., L. Jones, M. van Leeuwen, J. Dijksterhuis, B. De Kruijff, G. Eitzen y E. Breukink (2010). "Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(6): 2618-2625.
- Tharanathan, R. (2003). "Biodegradable films and composite coatings: past, present and future." Critical Review in Food Science and Technology 14: 71-78.
- Thomas, A. H. (1976). "Analysis and Assay of Polyene Antifungal Antibiotics. A Review." The Analyst 101: 321-340.
- Thomas, D. J. y W. Atwell (1999). Starch Modifications. Starches. USA, Eagen Press Handbook.
- Türe, H., E. Erođlu, B. Özen y F. Soyer (2009). "Physical properties of biopolymers containing natamycin and rosemary extract." International Journal of Food Science and Technology 44: 402-408.
- van de Voort, F. R., A. A. Ismail, J. Sedman y G. Emo (1994). "Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of the American Oil Chemists' Society 71(3): 243-253.
- van Soest, J. J. y P. Essers (1997). "Influence of amylose/amylopectin ratio on properties of extruded starch plastic sheets." Journal of Macromolecular Science, Part A 34(9): 1665-1689.

- van Tuil, R., P. Fowler, M. Lawther y C. J. Weber (2000). Properties of biobased packaging materials. Biobased packaging materials for the food industry: status and perspectives. Dinamarca, KVL: 13-44.
- Var, I., Z. Erginkaya, M. Guven y B. Kabak (2006). "Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period." Food Control 17: 132-136.
- Varadaraj, M. (2010). Capacity Building : Building Analytical Capacity for Microbial Food Safety. Ensuring Global Food Safety. C. Boisrobert, A. Stjepanovic, O. Sangsuk and H. Lelieveld. San Dlego, Elsevier: 151–176.
- Vierikova, M., E. Hrniciarikova y J. Lehotay (2015). "Determination of natamycin content in cheese using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 36: 2933-2943.
- Wachtler, V. y M. Balasubramanian (2006). "Yeast lipid rafts? - An emerging view." Trends in Cell Biology 16(1).
- Weber, C. J., V. Haugaard, R. Festersen y G. Bertelsen (2002). "Production and applications of biobased packaging materials for the food industry." Food Additives and Contaminants 19: 172-177.
- Welthagen, J. y B. Viljoen (1998). "Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening." International Journal of Food Microbiology 41(3): 185-194.
- Whistler, R. L., J. N. BeMiller y E. F. Paschall (2009). Starch: chemistry and technology, Elsevier.
- WHO (2001). "Global surveillance of foodborne disease: developing a strategy and its interaction with risk analysis". Geneva, World Health Organization.
- WHO (2007). "Evaluation of certain food additives and contaminants." WHO Expert Committee on Food Additives 940. Geneva, World Health Organization.
- Wu, Q. y L. Zhang (2001). "Preparation and characterization of thermoplastic starch mixed with waterborne polyurethane." Industrial and Engineering Chemical Research 40: 558-564.
- Wu, Y. P., M. Q. Ji, Q. Qi, Y. Q. Wang y L. Q. Zhang (2004). "Preparation, structure, and properties of starch/rubber composites prepared by co-coagulating rubber latex and starch paste." Macromolecular Rapid Communications 25: 565–570.
- Wypych, G. (2004). Handbook of plasticizers, ChemTec Publishing.
- Yangilar, F. y P. O. Yildiz (2016). "Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the ripening of Kashar cheese." Journal of the Science of Food and Agriculture 96: 2328-2336.
- Yu, H., Y. Cao y Q. Fang (2015). "Effects of Treatment Temperature on Properties of Starch-based Adhesives." BioResources 10: 3520-3530.

- Yu, Y.-H., C.-Y. Lin, J.-M. Yeh y W.-H. Lin (2003). "Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)–clay nanocomposite materials." Polymer 44: 3553–3560.
- Zhang, H. y G. Mittal (2010). "Biodegradable protein-based films from plant resources: a review." Environmental Progress & Sustainable Energy 23: 203-220.
- Zhang, Y. y J. Han (2006). "Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols." Journal of Food Science 71: 109-118.
- Zhang, Y., S. Gamarra, G. Garcia-Effron, S. Park, D. Perlin y R. Rao (2010). "Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs." PLoS Pathogens on line.
- Zhong, Z. y S. X. Sun (2005). "Thermal characterization and phase behavior of cornstarch studied by differential scanning calorimetry." Journal of Food Engineering 69: 453–459.
- Zhou, J., R. Ren, J. Tong, L. Xie y Z. Liu (2009). " Surface esterification of corn starch films: Reaction with dodecenyl succinic anhydride." Carbohydrate Polymers 78(4): 888-893.
- Zobel, H. F. (1988). "Starch crystal transformations and their industrial importance." Starch 40: 1-7.

## **8. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS**

### **7.1. Figuras**

#### **Capítulo 1**

**Figura 1.1.** Definición de bioplásticos: división según su biodegradabilidad y origen de la materia prima.

**Figura 1.2.** Estructura química de la amilosa.

**Figura 1.3** Estructura química de la amilopectina.

**Figura 1.4.** Evolución de los gránulos de almidón de maíz a lo largo del proceso de gelatinización.

**Figura 1.5.** Obtención de alcohol polivinílico a partir de poli (vinil acetato).

**Figura 1.6.** Estructura química del H<sub>12</sub>MDI.

**Figura 1.7.** Representación esquemática de la síntesis de un poliuretano.

**Figura 1.8.** Representación esquemática de la síntesis de un poliuretano y de un poli(uretano-urea).

**Figura 1.9.** Estructura química de (a) Aflatoxina M1 y (b) Ocratoxina A

**Figura 1.10.** Queso semi-duro en la sala de maduración de una quesería de la provincia de Buenos Aires, con crecimiento de mohos superficiales.

**Figura 1.11.** Estructura química del BHT.

**Figura 1.12.** Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol.

**Figura 1.13.** Estructura química del sorbato de potasio.

**Figura 1.14.** Estructura química de la natamicina.

#### **Capítulo 3**

**Figura 3.1.** Reactor utilizado para la síntesis del poliuretano.

**Figura 3.2.** Síntesis esquemática de la dispersión acuosa de poliuretano.

**Figura 3.3.** Obtención de las películas poliméricas por casting.

**Figura 3.4.** Celda utilizada en los ensayos de permeabilidad al vapor de agua.

**Figura 3.5.** Difractograma típico de un material semicristalino.

**Figura 3.6.** Espectros ATR corregidos-FTIR de películas de (a) almidón, (b) PVA y (c) PU puros.

**Figura 3.7.** Espectro ATR corregidos de películas de almidón, PVA y la mezcla almidón/PVA en relación 70:30, detalle de la región 1500 a 700  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 3.8.** Espectros FTIR de películas de (a) almidón, (b) PVA y (c) mezcla almidón/PVA en relación 70:30, detalle de la región 3800 a 2700  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 3.9.** Espectros FTIR de películas de Almidón/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15.

**Figura 3.10.** Espectros FTIR de películas de (a) PU H<sub>12</sub>MDI, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15, (c) Alm/PVA/PU 70:25:5, y (d) Almidón/PVA 70:30, en las regiones de los modos vibracionales de -OH, C=O y C-O.

**Figura 3.11.** Espectros UV-visible de películas de PVA puro, Alm/PVA 70:30 y combinaciones de Alm/PVA/PU en proporciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15.

**Figura 3.12.** Flujo de calor reversible de almidón puro, PVA puro, PU H<sub>12</sub>MDI puro, Almidón/PVA 70:30 y Almidón/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15.

**Figura 3.13.** Diagramas de difracción de rayos-X entre 3 y 30° para las películas (a) Almidón/PVA 70:30, (b) Almidón/PVA/PU 70:25:5, (c) Almidón/PVA/PU 70:20:10 y (d) Almidón/PVA/PU 70:15:15.

**Figura 3.14.** Elongación máxima (%) de películas de almidón puro, Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con texturómetro.

**Figura 3.15.** Tensión máxima de ruptura ( $\text{N/mm}^2$ ) de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con texturómetro.

**Figura 3.16.** Propiedades mecánicas de películas de Alm/PVA 70:30 y las mezclas Alm/PVA/PU evaluadas a 25°C por DMA.

**Figura 3.17.** Módulo elástico,  $E_c$ , de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15.

**Figura 3.18.** Elongación máxima (%) de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU con composiciones: 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 obtenida con Análisis Dinámico Mecánico en modo tensión-deformación.

**Figura 3.19.** Imágenes SEM (5000x) de cortes transversales de películas de Alm/PVA 70:30 (a), Alm/PVA/PU 70:25:5 (b), Alm/PVA/PU 70:20:10 (c) y Alm/PVA/PU 70:15:15 (d).

**Figura 3.20.** Imágenes de SEM de superficie de películas Alm/PVA 70:30 (a), Alm/PVA/PU 70:25:5 (b), Alm/PVA/PU 70:20:10 (c).

**Figura 3.21.** Fotografías a contraluz de películas con antioxidantes BHT y  $\alpha$ -tocoferol. La elipse indica segregación de  $\alpha$ -tocoferol en forma de gotas de aceite.

**Figura 3.22.** Tensión máxima de ruptura ( $\text{N/mm}^2$ ) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %.

**Figura 3.23.** Módulo elástico (MPa) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %.

**Figura 3.24.** Elongación máxima de ruptura (%) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con  $\alpha$ -tocoferol al 1 % y BHT al 3 y 5 %.

**Figura 3.25.** Espectros FTIR de (a) BHT puro, (b) Alm/PVA/PU 70:20:10 BHT 3%, (c) Alm/PVA/PU 70:20:10.

**Figura 3.26.** Espectros FTIR de (a)  $\alpha$ -tocoferol puro, (b) película Alm/PVA/PU 70:20:10 aditivada con 1 % de  $\alpha$ -tocoferol y (c) película Alm/PVA/PU 70:20:10.

**Figura 3.27.** Fotografía de una película de Alm/PVA/PU 70:20:10 aditivada con 1 % de natamicina.

**Figura 3.28.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA 70:30, (b) Película Alm/PVA 70:30 cara sustrato con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

**Figura 3.29.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:25:5, (b) Película Alm/PVA/PU 70:25:5 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

**Figura 3.30.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:20:10, (b) Película Alm/PVA/PU 70:20:10 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

**Figura 3.31.** Espectros FTIR de (a) Película Alm/PVA/PU 70:15:15, (b) Película Alm/PVA/PU 70:15:15 cara aire con 1 % natamicina, (c) Natamicina pura.

**Figura 3.32.** Espectro de absorción UV de natamicina en solución acuosa.

**Figura 3.33.** Espectros UV de películas de Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:20:10 y Alm/PVA/PU 70:15:15 sin natamicina y con natamicina al 1 %.

**Figura 3.34.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:30 y 70:30 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.

**Figura 3.35.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:25:5 y 70:25:5 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.

**Figura 3.36.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:20:10 y 70:20:10 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.

**Figura 3.37.** Diagramas de difracción de rayos-X para películas de Alm/PVA 70:15:15 y 70:15:15 conteniendo 0,1 y 1% p/p de natamicina.

**Figura 3.38.** Tensión máxima de ruptura ( $\text{N/mm}^2$ ) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %.

**Figura 3.39.** Módulo elástico (MPa) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %.

**Figura 3.40.** Elongación máxima de ruptura (%) para películas de Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %.

**Figura 3.41.** Imágenes SEM (5000x) de cortes transversales de películas de (a) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina, (b) Alm/PVA/PU 70:25:5 con 1 % natamicina, (c) Alm/PVA/PU 70:20:10 con 1 % natamicina y (d) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina.

**Figura 3.42.** Imágenes de SEM de superficie de películas de (a) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina cara sustrato, (b) Alm/PVA 70:30 con 1 % natamicina cara aire, (c) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina cara sustrato y (d) Alm/PVA/PU 70:15:15 con 1 % natamicina cara aire.

#### **Capítulo 4**

**Figura 4.1.** Características del Queso Tybo marca Cayelac, empleado en los ensayos.

**Figura 4.2.** Fotografía de un cubo de queso recubierto con la formulación Alm/PVA/PU 70:25:5 conteniendo 1 % de natamicina, envasado al vacío.

**Figura 4.3.** Películas de almidón: a la izquierda a tiempo cero sobre soporte de vidrio simple, a la derecha sobre soporte tipo sándwich.

**Figura 4.4.** Espectro ATR-FTIR de aceite de oliva extra virgen puro al inicio y al final del ensayo acelerado de oxidación.

**Figura 4.5.** Relación  $A_{3006\text{cm}^{-1}}/A_{2854\text{cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 1 % p/p de  $\alpha$ -tocoferol, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo  $\alpha$ -tocoferol al 1 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C.

**Figura 4.6.** Relación  $A_{3006\text{cm}^{-1}}/A_{2854\text{cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 3 % p/p de BHT, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo BHT al 3 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C.

**Figura 4.7.** Relación  $A_{3006\text{cm}^{-1}}/A_{2854\text{cm}^{-1}}$  para aceite de oliva puro, aceite de oliva conteniendo una concentración de 5 % p/p de BHT, y para películas de Alm/PVA/PU en relaciones 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y conteniendo BHT al 5 % p/p; luego de 42 días de almacenamiento a 60 °C.

**Figura 4.8.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA 70:30 conteniendo 1 % de natamicina.

**Figura 4.9.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:25:5 conteniendo 1 % de natamicina.

**Figura 4.10.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:20:10 conteniendo 1 % de natamicina.

**Figura 4.11.** Espectros FTIR de natamicina pura y de las películas Alm/PVA/PU 70:15:15 conteniendo 1 % de natamicina.

**Figura 4.12.** Fotografías de trozos de quesos recubiertos con películas dopadas con diferentes colorantes.

**Figura 4.13.** Cubos de queso Tybo recubiertos con dispersión polimérica con colorante cristal violeta y corte de los mismos para medir espesor del recubrimiento aplicado.

**Figura 4.14.** Contenido de natamicina en la masa del queso expresado como mg de natamicina/kg de queso para cubos de queso recubiertos con mezclas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 aditivadas con 1 % de natamicina.

**Figura 4.15.** Película Alm/PVA 70:30 sobre agar con crecimiento de hongos ambientales *Alternaria sp* y *Cladosporium sp*.

**Figura 4.16.** Placa inoculada con *Penicillium spp 1* luego de 96 hs de incubación con (a) sorbato de potasio en solución al 1, 2 y 3 % y (b) natamicina en solución al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

**Figura 4.17.** Antimicogramas para *Penicillium spp 1* y *spp 2* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

**Figura 4.18.** Antimicogramas para *Penicillium spp 3* y *Fusarium sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

**Figura 4.19.** Antimicogramas para *Cladosporium sp* y *Alternaria sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

**Figura 4.20.** Antimicogramas para *Mucor sp* y *Aspergillus Niger sp* con natamicina al 0,1, 0,2 y 0,3 %.

**Figura 4.21.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1% de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1 % p/p y (f) película control Alm/PVA 70:30 frente a *Penicillium spp 1*.

**Figura 4.22.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1% de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1 % p/p y (f) película control Alm/PVA/PU 70:15:15 frente a *Penicillium spp 2*.

**Figura 4.23.** Halos de inhibición de películas (a) Alm/PVA 70:30, (b) Alm/PVA/PU 70:15:15 y (c) Alm/PVA/PU 70:25:5 aditivadas con 0,1 % de natamicina; (d) PU al 50 %, (e) natamicina al 0,1% p/p y (f) película control Alm/PVA/PU 70:25:5 frente a *Penicillium spp 3*.

**Figura 4.24.** Esquema de trabajo para el ensayo de conservación con cubos de queso con recubrimiento.

**Figura 4.25.** Quesos control sin recubrimiento y quesos con recubrimiento y Alm/PVA/PU 70:15:15 al comienzo del ensayo y luego de seis días de almacenamiento.

**Figura 4.26.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA 70:30 con 1 % de natamicina al comienzo del ensayo y luego de seis días de almacenamiento.

**Figura 4.27** Quesos con recubrimiento Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 1 % de natamicina al comienzo del ensayo y luego de seis días de almacenamiento.

**Figura 4.28.** Quesos control sin recubrimiento y quesos con recubrimiento y Alm/PVA/PU 70:15:15 al comienzo del ensayo y luego de cinco días de almacenamiento.

**Figura 4.29.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA 70:30 con 0,1 % de natamicina al comienzo del ensayo y luego de cinco días de almacenamiento.

**Figura 4.30.** Quesos con recubrimiento Alm/PVA/PU 70:25:5 y Alm/PVA/PU: 70:25:5 con 0,1 % de natamicina al comienzo del ensayo y luego de cinco días de almacenamiento.

## **7.2. Tablas**

### **Capítulo 1**

**Tabla 1.1.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la natamicina frente a distintos hongos.

**Tabla 1.2.** Aplicaciones de natamicina a distintos alimentos: concentración máxima permitida por el Codex Alimentario.

### **Capítulo 3**

**Tabla 3.1.** Formulaciones ensayadas y su evaluación en función de su flexibilidad, fragilidad y separación de fases.

**Tabla 3.2.** Proporciones de los componentes evaluados.

**Tabla 3.3.** Contenido porcentual de agua de las películas.

**Tabla 3.4.** Valores de grado de hinchamiento obtenidos para las distintas formulaciones de películas (t=24 hs).

**Tabla 3.5.** Principales asignaciones de las bandas FTIR del PU H<sub>12</sub>MDI/PPG2000.

**Tabla 3.6.** Transiciones térmicas de películas de los componentes puros y de las mezclas.

**Tabla 3.7.** Valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos  $T_5$ ,  $T_{50}$  y masa residual a 540 °C de los componentes puros y mezclas.

**Tabla 3.8.** Valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) obtenidos para las distintas formulaciones de películas.

**Tabla 3.9.** Contenido porcentual de agua de las películas aditivadas con 1 % p/p de natamicina.

**Tabla 3.10.** Valores de grado de hinchamiento obtenidos para las distintas formulaciones de películas con 1 % p/p de natamicina (t=24 hs).

**Tabla 3.11.** Valores de agua residual (%), temperatura inicial de descomposición (TID), índices térmicos  $T_5$ ,  $T_{50}$  y masa residual a 540 °C de películas aditivadas con 1 % de natamicina.

**Tabla 3.12.** Permeabilidad al vapor de agua de películas de Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15 de base y aditivadas con natamicina al 1 %.

#### **Capítulo 4**

**Tabla 4.1:** Tipo de alimento y simulante adecuado para los ensayos de migración.

**Tabla 4.2.** Evolución del peso de las películas de Alm/PVA/PU sumergidas en isooctano a lo largo del tiempo.

**Tabla 4.3.** Crecimiento de microorganismos para películas de Almidón puro (Alm), PVA puro (PVA), Alm/PVA 70:30 y Alm/PVA/PU 70:25:5, 70:20:10 y 70:15:15, expuestas al ambiente y sobre vidrio simple, doble vidrio tipo sándwich y agar al 2%, a 28 °C y en frío a 4-6 °C inoculadas con *Penicillium spp 1* y *spp 2*.

**Tabla 4.4.** Diámetros de halos de inhibición (mm) para películas de Alm/PVA 70:30, Alm/PVA/PU 70:25:5, Alm/PVA/PU 70:15:15 aditivadas con 0,1 % de natamicina; PU y natamicina al 0,1 % p/p en solución.