



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

“Desarrollo de películas proteicas para el envasado activo e inteligente de alimentos”

Tesista: Lic. Musso Yanina S.

Directora: Dra. Mauri Adriana N.

Codirector: Dr. Salgado Pablo R.

Año 2017

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Adriana N. Mauri y el Dr. Pablo R. Salgado

Agradecimientos

- A la Dra. Adriana Mauri por haberme permitido realizar este trabajo y haberme ayudado a concretar este proyecto profesional,
- Al Dr. Pablo Salgado mi co-director de tesis, por su participación y constante apoyo; por su experiencia y sugerencias,
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el doctorado en forma gratuita.
- A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haber garantizado la financiación de este trabajo.
- A la Dra. Ana Pilosof y a la Dra. Maria Julia Martinez por permitirme realizar las determinaciones de tamaño de partícula en su laboratorio.
- A mis compañeros de laboratorio, Agus, Ana, Susan, Charlie, Cristian, Santi, Fabri, María, Martín, Pau, Ale y las chicas del entepiso Vane, Fla, Coqui y Caro, por las risas, los buenos y no tanto) momentos juntos, por las salidas, y los mates.
- A Lu y Mati por su gran compañerismo, ayuda y cariño.
- A todos mis compañeros del CIDCA por su colaboración y por haber compartido lindos momentos de trabajo.
- A mi familia, por el apoyo incondicional y paciencia.
- A Jose, Megui y Flor por acompañarme siempre, aun a la distancia.
- A Marce, por acompañarme en este proyecto, por siempre sacarme una sonrisa.

RESUMEN

Tradicionalmente, el objetivo principal al envasar un alimento era proteger al producto del medio externo (por medio de una barrera pasiva) y así prolongar su período de vida útil. Actualmente se espera que el envase tenga un rol más activo, sin generar daño al medio ambiente. Los cambios en el modo en que los alimentos son producidos, distribuidos, almacenados y comercializados, así como las crecientes demandas de los consumidores en cuanto a seguridad, calidad, conveniencia y mayor vida útil de los alimentos, imponen nuevas exigencias al comportamiento de los envases alimentarios. También la tendencia de asegurar la calidad y seguridad de los alimentos, sin el agregado de aditivos y conservantes (o con la menor cantidad posible de los mismos), contribuyen a que el envase cumpla un papel más significativo. En este sentido, se ha incrementado en forma marcada el interés en el desarrollo de sistemas de envasado activos y/o inteligentes usando polímeros biodegradables para su formación. Estas nuevas tecnologías podrían tener gran potencial para contribuir a mantener la calidad de los productos y a asegurarla a lo largo de la cadena de distribución, así como para reemplazar a los polímeros sintéticos derivados del petróleo en algunas aplicaciones.

En este marco el objetivo de este trabajo de Tesis fue desarrollar películas activas e inteligentes de matriz proteica para su uso en envases de alimentos.

La totalidad de la Tesis se realizó utilizando dos fuentes proteicas diferentes: gelatina y soja. Ambas pueden considerarse agroproteínas, ya que pueden obtenerse de derivados agroindustriales: gelatina de la industria cárnica y soja del *pellet* residual de la industria aceitera. Según la necesidad de cada aplicación se utilizó una u otra fuente proteica.

En este trabajo se estudió: la formación de películas proteicas con capacidad de respuesta a cambios de pH del medio y temperatura, evaluando también el efecto que los compuestos adicionados ejercían sobre las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas de las películas. Se obtuvieron películas por *casting* con distinta coloración dependiendo del colorante utilizado y del pH de la dispersión. Inicialmente se evaluó el agregado de los indicadores de pH sintéticos: naranja de metilo, rojo neutro y verde de bromocresol a películas de gelatina. Todas las películas lograron cambiar su coloración al ponerlas en contacto con medios líquidos, semisólidos y gaseosos de distintos pH, simulando distintos tipos de alimentos o el espacio de cabeza de un envase.

Estos materiales permitirían indicar indirectamente el desarrollo microbiano durante el transporte y almacenamiento de los alimentos, ya que en general este deterioro va acompañado con cambios de pH.

También se analizó la mezcla de los distintos colorantes, lográndose disminuir el rango de viraje de los indicadores, de manera de encontrar aplicaciones más específicas.

Se evaluó la aplicación de estos materiales desarrollados como envases de productos cárnicos. Se analizó la correlación entre el pH de carnes de distintos tipos y su crecimiento microbiano durante el almacenamiento refrigerado. Sólo con pescado el cambio de pH fue sensible al crecimiento microbiano en una magnitud capaz de ser detectada por las películas. Las películas aditivadas con mezclas de naranja de metilo y verde de bromocresol a pH 6, se utilizaron para envasar carne de pescado. Las mismas fueron capaces de cambiar su color verde al violeta cuando el crecimiento microbiano aumentó dos órdenes de magnitud al segundo día de almacenamiento. Se logró así un envase biodegradable inteligente que pudo modificar su coloración frente a cambios de pH, pudiendo ser utilizado para indicar deterioro microbiano en pescado.

La evidencia de que la matriz de proteína no interfería con la decoloración de los indicadores ácido-base, condujo a la búsqueda de colorantes de grado alimentario para el desarrollo de materiales aptos para envasar alimentos. Con este fin se evaluó la utilización de curcumina y antocianinas extraídas de repollo colorado. Dada la baja solubilidad en agua de ambos componentes se analizó el efecto de reemplazar agua por mezclas hidroalcohólicas como solventes en las dispersiones filmogénicas. Las películas desarrolladas además de lograr responder de manera efectiva a los cambios de pH del medio presentaron importantes propiedades antioxidantes (aunque no antimicrobianas). Estas propiedades bioactivas hacen a estos materiales especialmente interesantes para ser utilizados como envases activos de productos susceptibles a la oxidación.

Para obtener materiales que respondan a cambios de temperatura se estudió el agregado de tintas termocrómicas a películas proteicas. La impresión de las tintas sobre las películas se realizó en el establecimiento Megacolor S.R.L., con un tratamiento industrial que también implicaba radiación UV. Sólo las películas de soja soportaron la impresión y lograron indicar de manera reversible cambios de temperatura, por lo que estos materiales podrían ser asociados a aplicaciones de confort. Las películas impresas presentaron propiedades físicoquímicas superiores que las de las películas proteicas control, por efecto de las tintas y principalmente por efecto del tratamiento UV empleado

para su aplicación. Este tratamiento favoreció el entrecruzamiento proteico, principalmente a través de interacciones puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, y otras interacciones covalentes que no fueron precisadas, lo que provocó mejoras significativas en la resistencia mecánica de los materiales y una disminución en su susceptibilidad al agua.

Por último, se estudió la obtención de nanopartículas de plata y su agregado a matrices proteicas de gelatina con el fin de obtener materiales antimicrobianos. Estas nanopartículas se obtuvieron siguiendo dos estrategias: sintetizándolas en la misma solución filmogénica, o previo a su agregado a la formulación usando citrato de sodio como reductor. El tamaño nanoscópico de las partículas fue confirmado por espectroscopía UV, por dispersión de luz dinámica y por microscopía electrónica de transferencia. La presencia de estas nanopartículas en la formulación le otorgó a las películas de gelatina una actividad antimicrobiana muy importante frente a *Escherichia coli* (microorganismos común en el deterioro de alimentos, utilizada como sistema modelo) y logró ejercer un efecto refuerzo sobre la matriz proteica.

Índice General

| | |
|--|----------|
| I. Antecedentes y relevancia de la temática | 1 |
| I.1. Envases Alimentarios: del envase tradicional a los nuevos conceptos | 1 |
| I.2. “Smart packaging” | 3 |
| I.3. Envases activos | 4 |
| I.3.1 Controladores de humedad | 6 |
| I.3.2 Emisores/absorbedores de dióxido de carbono | 6 |
| I.3.3 Capturadores de etileno | 7 |
| I.3.4 Capturadores de oxígeno | 8 |
| I.3.5 Emisores de etanol | 8 |
| I.3.6 Capturadores de <i>flavours</i> | 9 |
| I.3.7 Antioxidantes | 10 |
| I.3.8 Antimicrobianos | 11 |
| I.3.9 Envases con atmósferas modificadas (MAP) | 13 |
| I.3.10 Envases con auto-calentamiento (self-heating), auto-enfriamiento (self-cooling) y activos para microondas | 14 |
| I.4 Envases inteligentes | 15 |
| I.4.1 Indicadores de frescura y de deterioro microbiano | 16 |
| I.4.2 Indicadores de gases e indicadores de integridad | 18 |

| | |
|---|-----------|
| I.4.3 Indicadores tiempo-temperatura (TTI) | 19 |
| I.4.4 Indicadores de abuso térmico y de confort (uso de tintas termocrómicas) | 21 |
| I.4.5 Biosensores | 21 |
| I.4.6 Narices y lenguas electrónicas | 23 |
| I.4.7 Identificadores de radio frecuencia (RFID) | 23 |
| I.5. Mercado actual y proyecciones de los envases activos e inteligentes | 25 |
| I.6. Bioplásticos | 26 |
| I.7 Materiales proteicos | 28 |
| I.7.1 Características de los materiales proteicos | 28 |
| I.7.2 Estrategias para mejorar la funcionalidad de los materiales proteicos | 31 |
| I.7.2.1 Aplicación de tratamientos físicos y / o químicos | 31 |
| I.7.2.2 Incorporación de aditivos | 33 |
| I.7.2.3 Formación de materiales compuestos y nanocompuestos | 35 |
| II. Objetivos | 38 |
| II.1 Objetivo general | 38 |
| II.2 Objetivos particulares | 38 |
| II.3 Soja y gelatina como fuentes de proteínas a utilizar | 39 |
| II.3.1 Gelatina | 39 |
| II.3.2 Proteínas de soja | 40 |

| | |
|--|-----------|
| III. Películas proteicas capaces de indicar modificaciones en el pH del medio, a través del cambio de su coloración | 42 |
| III.1. Películas proteicas aditivadas con indicadores ácido-base sintéticos | 44 |
| III.1.1 Introducción | 44 |
| III.1.2 Materiales y métodos | 46 |
| III.1.2.1 Materiales | 46 |
| III.1.2.2 Formación de las películas | 47 |
| III.1.2.3 Caracterización de las películas | 47 |
| III.1.2.3.1 Espesor | 47 |
| III.1.2.3.2 Contenido de agua (MC) | 48 |
| III.1.2.3.3 Color | 48 |
| III.1.2.3.4 Espectro de absorción de luz visible | 49 |
| III.1.2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) | 49 |
| III.1.2.3.6 Solubilidad en agua (S) | 50 |
| III.1.2.3.7 Temperatura de transición vítrea (Tg) | 51 |
| III.1.2.3.8 Propiedades mecánicas | 51 |
| III.1.2.4 Respuesta de las películas a los cambios de pH | 52 |
| III.1.2.5 Análisis estadístico | 53 |
| III.1.3 Resultados y discusión | 53 |
| III.1.3.1 Apariencia y propiedades ópticas de películas | 53 |

| | |
|---|-----------|
| III.1.3.2 Respuesta de las películas aditivadas con colorantes sintéticos a los cambios de pH | 56 |
| III.1.3.3 Efecto de la presencia de los indicadores ácido base sintéticos y del pH de la dispersión filmogénica sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes | 61 |
| III.1.4 Conclusiones | 65 |
| III.2. Películas proteicas capaces de indicar deterioro microbiano en carnes a través de su respuesta frente a cambios de pH. | 66 |
| III.2.1 Introducción | 66 |
| III.2.2 Materiales y métodos | 67 |
| III.2.2.1 Materiales | 67 |
| III.2.2.2 Relación entre recuento microbiano y pH de muestras cárnicas almacenadas en refrigeración | 68 |
| III.2.2.3 Formación de las películas | 68 |
| III.2.2.4 Caracterización de las películas | 69 |
| III.2.2.5 Respuesta de las películas a los cambios de pH | 69 |
| III.2.2.6 Respuesta de las películas a los cambios de pH durante el almacenamiento refrigerado de productos cárnicos | 70 |
| III.2.2.7 Análisis estadístico | 71 |
| III.2.3 Resultados y discusión | 71 |
| III.2.3.1 Relación entre el desarrollo microbiano en muestras cárnicas y la variación de su pH | 71 |
| III.2.3.2 Selección de la formulación del material a utilizar para el envasado inteligente de pescado | 73 |
| III.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas de la película de gelatina aditivada con una mezcla de indicadores ácido-base NM+ VBC. | 76 |

| | |
|---|-----------|
| III.2.3.4 Capacidad de respuesta a cambios de pH de películas G + (NM+VBC) | 78 |
| III.2.3.5 Evaluación de las películas aditivadas con la mezcla de colorantes (NM+VBC) como envase inteligente para carne de pescado | 79 |
| III.2.4 Conclusiones | 81 |
| III.3. Películas proteicas aditivadas con curcumina | 83 |
| III.3.1. Introducción | 83 |
| III.3.2 Materiales y métodos | 85 |
| III.3.2.1 Materiales | 85 |
| III.3.2.2 Formación de las películas | 85 |
| III.3.2.3 Caracterización de las películas | 86 |
| III.3.2.3.1 Propiedades antioxidantes | 86 |
| III.3.2.3.2 Propiedades antimicrobianas | 87 |
| III.3.2.4 Análisis estadístico | 88 |
| III.3.3 Resultados y discusión | 88 |
| III.3.3.1 Aspecto y propiedades ópticas de las películas | 88 |
| III.3.3.2 Respuesta de las películas a cambios de pH del medio | 92 |
| III.3.3.3 Efecto del pH, el solvente y la adición de curcumina en las propiedades fisicoquímicas de las películas | 93 |
| III.3.3.4 Propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las películas | 96 |
| III.3.4 Conclusiones | 98 |

| | |
|---|-----------|
| III.4 Películas proteicas aditivadas con antocianinas extraídas de repollo colorado (<i>Brassica oleracea</i>) | 99 |
| III.4.1 Introducción | 99 |
| III.4.2 Materiales y métodos | 103 |
| III.4.2.1 Materiales | 103 |
| III.4.2.2 Preparación de los extractos de antocianinas | 104 |
| III.4.2.3 Caracterización de los extractos | 104 |
| III.4.2.3.1 Determinación de la concentración de antocianinas | 104 |
| III.4.2.3.2 Determinación del perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 105 |
| III.4.2.3.3 Determinación de los espectros de absorción de luz UV-visible | 105 |
| III.4.2.4 Formación de las películas | 105 |
| III.4.2.5 Caracterización de las películas | 106 |
| III.4.2.6 Análisis estadístico | 106 |
| II.4.3 Resultados y discusión | 107 |
| II.4.3.1 Extractos de antocianinas | 107 |
| III.4.3.2 Aspecto y propiedades ópticas de las películas con extracto de repollo colorado | 109 |
| III.4.3.3 Respuestas de las películas con extracto de repollo colorado frente al pH del medio | 110 |
| III.4.3.4 Efecto del extracto de antocianinas de repollo colorado en las propiedades fisicoquímicas de las películas | 112 |
| III.4.3.5 Actividad antioxidante y antimicrobiana de las películas | 114 |

| | |
|---|------------|
| III.4.4 Conclusiones | 116 |
| IV. Películas proteicas con capacidad de respuesta a cambios de temperatura | 117 |
| IV.1 Introducción | 117 |
| IV.2 Materiales y métodos | 119 |
| IV.2.1. Materiales | 119 |
| IV.2.1.1. Fuente proteica | 119 |
| IV.2.1.2. Tintas termocrómicas. | 120 |
| IV.2.2. Formación de las películas | 120 |
| IV.2.3 Caracterización de las películas | 121 |
| IV.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 121 |
| IV.2.3.2 Ángulo de contacto | 122 |
| IV.2.3.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) | 122 |
| IV.2.3.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas | 122 |
| IV.2.3.5 Opacidad | 123 |
| IV.2.3.6 Capacidad de respuesta de las películas frente a cambios de temperatura | 123 |
| IV.2.3.7 Calorimetría diferencial de barrido | 123 |
| IV.2.4 Análisis estadístico | 124 |
| IV.3 Resultados y discusión | 124 |

| | |
|---|-----|
| IV.3.1 Apariencia de las películas proteicas de soja y gelatina | 124 |
| IV.3.2 Efecto del tratamiento UV sobre las propiedades de películas proteicas de soja | 125 |
| IV.3.3 Efecto de la impresión de tintas termocrómicas sobre la funcionalidad de películas proteicas de soja | 131 |
| IV.3.4 Respuesta a los cambios de temperatura de las películas proteicas impresas con tintas termocrómicas | 137 |
| IV.4 Conclusiones | 141 |
| V. Películas de gelatina con actividad antimicrobiana activadas con nanopartículas de plata | 142 |
| V.1. Introducción | 142 |
| V.2. Objetivos | 146 |
| V.3. Materiales y métodos | 147 |
| V.3.1 Materiales | 147 |
| V.3.2 Síntesis de nanopartículas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizador (NPA _g c). | 147 |
| V.3.3 Síntesis de nanopartículas de plata en la misma dispersión filmogénica (NPA _g) | 147 |
| V.3.4 Caracterización de las nanopartículas de plata | 148 |
| V.3.4.1 Determinación del tamaño de partícula | 148 |
| V.3.4.2 Espectro de absorción UV-visible | 148 |
| V.3.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 149 |
| V.3.5 Formación de las películas de gelatina con NPA _g formadas con citrato de sodio | 149 |

| | |
|---|-----|
| V.3.6 Formación de las películas de gelatina con NPAg formadas en la misma dispersión filmogénica | 150 |
| V.3.7 Caracterización de las películas de gelatina aditivadas con NPAg | 150 |
| V.3.8 Capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y de las películas activadas | 151 |
| V.3.9 Análisis estadístico | 151 |
| V.4 Resultados y discusión | 152 |
| V.4.1 Selección de las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata obtenidas por reducción con citrato de sodio | 152 |
| V.4.2 Selección de las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata en la dispersión filmogénica. | 157 |
| V.4.3 Películas de gelatina aditivadas con nanopartículas de plata obtenidas previamente usando citrato de sodio como reductor/estabilizante. | 166 |
| V.4.4 Películas de gelatina aditivadas con nanopartículas de plata formadas <i>in-situ</i> en la dispersión filmogénica | 172 |
| V.5. Conclusiones | 177 |
| VI. Conclusiones Generales | 178 |
| VII. Referencias Bibliográficas | 181 |

I. Antecedentes y relevancia de la temática

I. Antecedentes y relevancia de la temática

I.1. Envases Alimentarios: del envase tradicional a los nuevos conceptos

En la sociedad actual, los envases son esenciales. Envuelven, mejoran y protegen los productos que compramos, desde su procesamiento y fabricación, durante su manipuleo y almacenamiento, hasta llegar al consumidor. Sin envases, el manipuleo de los productos sería desordenado, ineficiente y costoso, y su comercialización prácticamente imposible. El sector de envases representa aproximadamente el 2% del producto bruto interno (PBI) en los países desarrollados. Aproximadamente la mitad de todos los envases se utilizan para alimentos (Robertson, 2016). El envasado de alimentos juega un rol fundamental en industria alimentaria moderna, ya que constituye uno de los procesos principales para preservar la calidad de los productos alimenticios durante su transporte, almacenamiento y uso final (Ghaani y col., 2016).

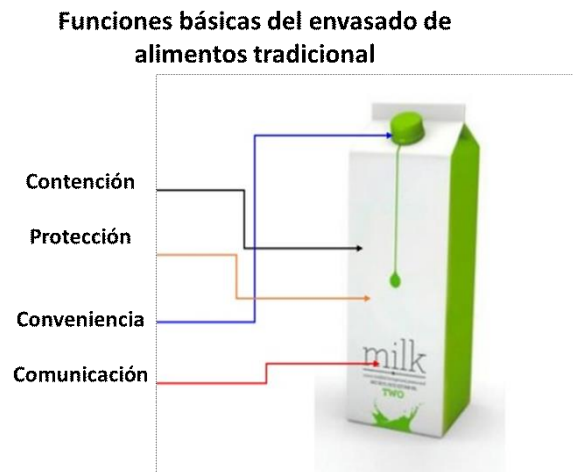


Figura I.1. Funciones básicas del envasado de alimentos tradicional

El envasado de alimentos tradicional tiene cuatro funciones básicas: protección, contención, comunicación y conveniencia (Biji y col., 2015). Los envases se utilizan para proteger el producto del deterioro que pueden provocar algunas condiciones ambientales externas tales como contaminación química y microbiana, vapor de agua, oxígeno, calor, luz, olores, insectos, suciedad, partículas de polvo, etc. (Robertson, 2012; Fuertes y col., 2016). Actúan como contenedores para productos alimenticios con formas y tamaños diferentes con el objetivo de optimizar la eficiencia logística (Yam y Lee, 2012). Se comunican con el consumidor a través de textos escritos (como la lista de ingredientes, contenido nutricional, directrices sobre preparación, etc.) y el logotipo de la marca. Se

adecúan al estilo de vida del consumidor, por ejemplo, en el ahorro de tiempo (aptos para contener comida lista para comer) o facilitar su manipulación (de fácil apertura, resellables o aptos para microondas) (Vanderroost y col., 2014; Ghaani y col., 2016). La figura I.1 ilustra estas funciones con un envase de leche, a modo de ejemplo. Estas funciones las cumplen minimizando la interacción entre el alimento y el envase (Lee y col., 2014).

Desde hace 4 décadas los envases plásticos son los más utilizados por la industria alimentaria por ser económicos, funcionales, livianos y muy versátiles ya que pueden ser rígidos (botellas, frascos, cajas, estuches), termoformados (bandejas para viandas) o flexibles (mallas tejidas, multicapas, películas). Por sus características han reemplazado en muchas aplicaciones a otros materiales que tradicionalmente se usaban para este fin como vidrio, metales (aluminio, laminados, hojalata y acero), papel y cartón (Brody y col., 2008), y hoy en día constituyen el 37% de los materiales de envases para alimentos (Food Packaging Forum, 2015). Este uso masivo ha provocado un serio problema ambiental mundial, ya que la mayoría de estos materiales son derivados del petróleo, no degradables y durante su producción y deposición contaminan el medio ambiente (Bohlmann, 2007). En la Figura I.2 se presentan a modo de ejemplo una gran variedad de alimentos protegidos y contenidos en distintos envases plásticos.



Figura I.2. Alimentos envasados en materiales poliméricos.

En la actualidad las nuevas tecnologías de envasado de alimentos intentan dar respuesta a las demandas de los consumidores e industriales. Los cambios en las prácticas de producción y venta de los alimentos (así por ejemplo la globalización del mercado que resulta en una distribución de los alimentos más prolongada), los modos de vida de los consumidores (que reducen el tiempo dedicado a la compra de alimentos frescos y la

cocina), y el avance de nuevas áreas del conocimiento, como la nanotecnología y biotecnología, actúan como fuerzas motrices para el desarrollo de conceptos de nuevos y mejores envases que logren prolongar la vida útil de los alimentos, manteniendo y supervisando su inocuidad y calidad (Dainelli y col., 2008). Por otra parte, el desarrollo de nuevos materiales de naturaleza biodegradable y renovables para ser utilizados como envases intenta dar respuesta a la necesidad de proteger el medio ambiente. En este contexto, surgen los nuevos conceptos de "*smart packaging*" que incluye "*sistemas de envases activos*", que interactúan con el contenido, y "*sistemas de envases inteligentes*" que, además de interactuar con el contenido, establecen una comunicación con el consumidor (Lagaron y col., 2014; Biji y col., 2015).

1.2. "*Smart packaging*"

"*Smart packaging*" es un término amplio que abarca una gama de conceptos de envasado relativamente nuevos, la mayoría de los cuales pueden incluirse en una de las dos categorías principales: envases activos y envases inteligentes (Kerry, 2012). Si bien estos términos están estrechamente relacionados, hay una distinción importante entre ambos (Han, 2014). Teniendo en cuenta las características que describen diferentes autores, podemos definir como:

- **envase activo** a "aquel que cambia el estado de los alimentos envasados para prolongar la vida útil o mejorar las propiedades sensoriales o de seguridad, manteniendo al mismo tiempo la calidad de los alimentos envasados" (Ahvenainen, 2003). Para esto, en algunos casos se han incluido algunos aditivos en el material de envasado o en el espacio de cabeza para mejorar el rendimiento del envase (Robertson, 2006).

En este sentido, la legislación de la Comunidad Europea define como "materiales y componentes activos a aquellos destinados a prolongar la vida útil o mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que liberen o absorban sustancias hacia o desde los alimentos envasados y el ambiente que rodea a los alimentos" (Framework Regulation on Food Contact Materials 1935/2004 y 450/2009, 2016). Estas definiciones implican una interacción del producto, el envase y el medio ambiente con el fin de extender la vida útil y/o mantener la calidad, la seguridad y las propiedades organolépticas del alimento (Vanderroost y col., 2014; Biji y col., 2015; Fang y col., 2017).

- **envase inteligente** a un “sistema de envasado capaz de llevar a cabo funciones inteligentes, como detectar, registrar, localizar, comunicar y aplicar la lógica científica, para facilitar la toma de decisiones, prolongar la vida útil, mejorar la seguridad y calidad, proporcionar información y advertir sobre posibles problemas” (Yam y col., 2005). El Reglamento Marco (CE) nº 1935/2004 (Framework Regulation on Food Contact Materials 1935/2004 and 450/2009,2016) los reconoce como “aquellos materiales y objetos que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno que rodea al alimento”.

Estos sistemas, que se adjuntan como etiquetas, o se incorporan o imprimen en el material de envasado de alimentos, ofrecen mejores posibilidades para supervisar la calidad del producto, rastrear los puntos críticos y proporcionar información más detallada en toda la cadena de suministro de alimentos (almacenamiento, transporte, distribución y venta) (Lee y col., 2015). Pueden proporcionar información no sólo sobre el producto en sí (origen, fecha de vencimiento, composición) sino que también pueden informar sobre la historia del producto (condiciones de almacenamiento, composición del espacio de cabeza, crecimiento microbiano, etc.) (Realini y col., 2014). Así, el envase inteligente es una extensión de la función de comunicación de los envases tradicionales de alimentos (Fuertes y col., 2016).

A diferencia de los sistemas de envasado activos, los envases inteligentes no actúan directamente para extender la vida útil de los alimentos y no tienen la intención de liberar sus componentes en el alimento. En cambio, los envases inteligentes tienen como objetivo transmitir información a las partes interesadas de las cadenas de suministro de alimentos (por ejemplo, fabricantes, minoristas y consumidores) relacionadas con la calidad de los alimentos (Restuccia y col., 2010).

Pero debe tenerse en cuenta que los términos envasado inteligente y activo no son mutuamente exclusivos, ya que algunos sistemas de envasado pueden clasificarse como ambos (Fang y col., 2017).

I.3. Envases activos

El envasado activo es una de las tecnologías más dinámicas utilizadas para preservar los alimentos (Dainelli y col., 2008). Los principios del envasado activo están basados en las propiedades intrínsecas del polímero o en las propiedades de los aditivos específicos que se incorporan en los sistemas de envasado (Gontard, 2000; Mellinas y col., 2015; Fuertes y col., 2016). Algunos biopolímeros tales como el quitosano tienen actividad antibacteriana

y antifúngica *per se*, que puede atribuirse a cambios en la permeabilidad celular de los microorganismos causados por interacciones entre los grupos amina del quitosano y las cargas electronegativas sobre la superficie celular (Dutta y col., 2009; Kalia y col., 2015). La introducción de un monómero activo dentro de la cadena polimérica, puede conducir también a polímeros con nuevas funcionalidades (Dainelli y col., 2008). Los agentes activos se pueden incorporar dentro o sobre la superficie de los materiales de envasado, y también en elementos particulares asociados al envase tales como bolsitas, etiquetas o tapas de botellas (Dainelli y col., 2008; Ortiz y col., 2013; Gómez-Estaca y col., 2014) en lugar de aplicarlos directamente sobre los alimentos, con el fin de alcanzar el objetivo deseado con concentraciones más bajas, limitando así los sabores y olores no deseados a los alimentos (McClements, 2015; Kapetanakou y col., 2016). Estos compuestos activos se incorporan para liberarse o absorber sustancias del alimento envasado o su medio ambiente circundante, o para realizar cambios en la composición o las características organolépticas del alimento; con la condición de que estos cambios se ajusten a lo previsto en las legislaciones vigentes (Ortiz y col., 2014).

La naturaleza de los agentes activos puede ser diversa, incluyendo ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol, polifenoles, hidrolizados de proteínas, etc. (Salgado y col., 2015). Hoy en día hay un interés especial en el uso de aditivos naturales, en lugar de los de origen sintético -a veces asociados con ciertos riesgos para la salud-. Incluso algunos residuos o subproductos agroindustriales, como los derivados del procesamiento de frutas y hortalizas, o de las industrias del vino, la cerveza, los productos lácteos y de la carne, proporcionan fuentes prácticas y económicas de potentes compuestos activos, como aceites esenciales, extractos, polifenoles, pigmentos, péptidos, etc., que podrían sustituir a los sintéticos (Balasundram y col., 2006; Sanches-Silva y col., 2014). Las características de los agentes activos, especialmente su resistencia térmica y su mecanismo de acción, determinará la técnica de procesamiento del material de envasado a utilizar para evitar el daño en estos compuestos durante el proceso y asegurar su actividad en el envase.

Los sistemas de envase activos actualmente utilizados en la industria alimentaria se pueden agrupar en:

1.3.1 Controladores de humedad: Estos dispositivos intentan controlar la actividad acuosa y así reducir el desarrollo microbiano; eliminar el agua de la descongelación en productos congelados y la sangre o fluidos de productos alimenticios musculares (por ejemplo, carne y aves de corral); evitar la condensación o la deshidratación excesiva de productos frescos (frutas, verduras, productos cárnicos); mantener las propiedades de los alimentos secos para prevenir el apelmazamiento en productos en polvo como leche o café instantáneo, el ablandamiento de productos crujientes tales como galletas, y el humedecimiento de productos higroscópicos como dulces y caramelos; y mantener bajo control la oxidación de lípidos (por ejemplo, en queso y nueces) (Vermeiren y col., 1999; Brody y col., 2008). Los sistemas de absorción de humedad más comunes consisten en un polímero superabsorbente (por ejemplo, sales de poliacrilato, carboximetilcelulosa y copolímeros de almidón que tienen una afinidad muy fuerte con el agua) situados entre dos capas de un polímero microporoso (por ejemplo polietileno o polipropileno). Estos materiales se utilizan como almohadillas de absorción que se encuentran típicamente en los productos alimenticios de músculo fresco con formato de bandeja (Kerry y col., 2006). En los alimentos secos se utilizan desecantes tales como sílica gel, óxido de calcio, arcillas activadas y minerales. También pueden incorporarse en la matriz del envase (Dobrucka y col., 2014). La funcionalidad de estos sistemas puede ampliarse mediante el agregado de otros componentes activos tales como eliminadores de oxígeno, antimicrobianos y generadores de dióxido de carbono (Brody y col. 2008).

1.3.2 Emisores/absorbedores de dióxido de carbono: El dióxido de carbono puede ser adicionado a los envases para provocar efectos beneficiosos, por ejemplo, para eliminar el crecimiento microbiano en ciertos productos tales como carne fresca, aves de corral, queso y productos horneados (López-Rubio y col., 2004); para reducir la tasa de respiración de los productos frescos y para evitar el colapso del envase o el vacío parcial causado por los eliminadores de oxígeno (Vermeiren y col., 1999). Por el contrario, los altos niveles de dióxido de carbono resultantes del deterioro de los alimentos o de las reacciones oxidativas pueden causar efectos adversos en calidad en los productos alimenticios. El exceso de dióxido de carbono puede eliminarse utilizando plásticos altamente permeables (Brody y col., 2008). Algunos generadores y absorbentes de dióxido de carbono pueden utilizarse en forma de bolsitas o etiquetas. Las pérdidas por goteo por ejemplo en carnes se absorben en almohadillas y reaccionan con ácido cítrico y

bicarbonato de sodio presentes en la almohadilla dando como resultado la generación de dióxido de carbono (Kerry y col., 2006). Este tipo de envase activo se asocia frecuentemente con sistemas de atmósfera modificada (MAP) para equilibrar las pérdidas de CO₂ debidas a la disolución en la carne y la permeación a través del material de envase (Coma, 2008). Los eliminadores de CO₂ se utilizan principalmente en cafés tostados frescos para retrasar el proceso de "envejecimiento" y de este modo previene la pérdida de compuestos volátiles (Biji y col., 2015).

1.3.3 Capturadores de etileno: El etileno (C₂H₄) es una hormona natural de crecimiento de los vegetales que acelera la respiración de las frutas y verduras, induce la maduración, ablandamiento y senescencia de los frutos, incluso a baja concentración. Eliminar el etileno de un envase ayuda a retrasar la tasa de maduración de frutas climatéricas, un punto crítico para la importación o exportación de frutas frescas. El agente más común de la eliminación del etileno es el permanganato de potasio, que oxida el etileno a acetato y etanol (López-Rubio y col., 2004). El permanganato de potasio inmovilizado sobre minerales inertes está disponible en sobres para envases y en mantas que pueden colocarse en salas de almacenamiento de productos sin integrarse en el material de embalaje que está en contacto con los alimentos (Biji y col., 2015). El uso de 1-metilciclopropano (1-MCP) es otra alternativa para minimizar el efecto del etileno. Su mecanismo de acción implica su unión irreversible al receptor de etileno en los frutos, bloqueando así los efectos del etileno por inhibición competitiva. El 1-MCP se comercializa encapsulado en ciclodextrinas y se libera cuando la formulación se mezcla con agua (Watkins, 2006; Ortiz y col., 2013). Lee y col. (2005) evaluaron distintos sistemas de liberación de 1-MCP a partir de sobres hechos con polietileno de baja densidad (LDPE), acetato de polivinilo (PVA) y papel. Por su parte, Ortiz y col. (2013) mostraron que almohadillas formuladas con proteína de soja para la liberación de 1-MCP lograban retrasar el ablandamiento de tomates y podrían ser útiles para realizar tratamientos post-cosecha en el mismo envase, El etileno también puede eliminarse mediante adsorción física sobre superficies activas tales como carbón activado y carbón impregnado con catalizadores metálicos o arcilla activada (zeolita) embebida en policarbonatos, poliestirenos, polietilenos y bolsas de polipropileno (Brody y col., 2008; Lee y col., 2015).

1.3.4 Capturadores de oxígeno: La presencia de oxígeno dentro de un envase acelera el deterioro oxidativo de los alimentos. El oxígeno facilita el crecimiento de los microorganismos aeróbicos, la pérdida de aromas y/o sabores y el desarrollo de olores desagradables, los cambios de color no deseados, y las pérdidas nutricionales, reduciendo la estabilidad general y la vida útil de los alimentos (Hogan y col., 2008). Por lo tanto, el control de los niveles de oxígeno en los envases de alimentos es importante para limitar la velocidad de las reacciones de deterioro en los alimentos (Brody y col., 2008). A pesar de que los alimentos sensibles al oxígeno pueden ser envasados en atmósfera modificada (MAP) o al vacío, estos sistemas no eliminan completamente el oxígeno. El oxígeno que penetra a través de la película de envasado no se puede eliminar a través del sistema. Mediante el uso de eliminadores de oxígeno, que absorben el oxígeno residual después del envasado, se pueden minimizar los cambios de calidad en alimentos sensibles al oxígeno (Vermerien y col., 1999; Robertson, 2006).

La mayoría de los eliminadores de oxígeno actualmente disponibles se basan en bolsitas que contienen polvo de hierro con distintos catalizadores. Las sustancias químicas reaccionan con el agua suministrada por el alimento y producen un agente reductor metálico hidratado que absorbe el oxígeno y lo convierte en un óxido estable dentro del envase (Day, 2008). Los eliminadores no metálicos incluyen agentes reductores orgánicos tales como ácido ascórbico, sales de ascorbato o catecol. También hay colorantes fotosensibles que al ser irradiados con luz ultravioleta activan la eliminación de oxígeno (López-Rubio y col., 2004). Los sistemas enzimáticos incluyen a glucosa oxidasa y alcohol oxidasa. Esta última es una enzima que cataliza la oxidación de alcoholes primarios al correspondiente aldehído, con reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno. Estos sistemas son más costosos, motivo por el cual no son ampliamente utilizados (Dobrucka y col., 2014). Otros eliminadores de oxígeno también pueden actuar como generadores de dióxido de carbono (Lee y col., 2015).

1.3.5 Emisores de etanol: El etanol es utilizado como agente antimicrobiano, particularmente es eficaz contra hongos pero también puede inhibir el crecimiento de levaduras y bacterias. Varios informes han demostrado que pulverizar con etanol al 95% retrasa la aparición de hongos y alarga la vida útil de productos de panadería. Pero actualmente un método más práctico y seguro consiste en el uso de bolsitas emisoras de etanol (Day, 2003). Las películas y bolsitas contienen etanol absorbido o encapsulado en

un material portador que permite la liberación controlada de vapor de etanol. Por ejemplo, Ethicap es el emisor de etanol más popular en Japón, se compone de alcohol alimenticio (55%) y agua (10%) adsorbido sobre polvo de dióxido de silicio (35%) y contenido en una bolsita hecha de un papel y vinil acetato de etilo (EVA) laminado. Cuando el alimento se envasa con estas bolsitas la humedad es absorbida por el alimento y el vapor de etanol se libera y se difunde en el espacio de cabeza del envase (Dobrucka y col., 2014). Pero cabe señalar que el etanol también puede ser absorbido por el producto generando sabores desagradables que se pueden reducir calentando el alimento antes de ser consumido (Franke y col., 2002).

1.3.6 Capturadores de "flavours": Los capturadores de sabores y olores absorben moléculas gaseosas no deseadas tales como ingredientes volátiles del envase, metabolitos químicos de alimentos, productos de reacciones microbianas, productos de respiración o sabores no deseados provenientes de alimentos crudos (Rooney, 2005). Algunos ejemplos pueden ser: sulfuros y aminas producidas bioquímicamente a partir de degradación de proteínas, aldehídos y cetonas producidas a partir de oxidación de lípidos o glicólisis anaeróbica. (Brody y col., 2008). Estos compuestos volátiles resultantes se acumulan en el interior del envase y pueden ser eliminados selectivamente para evitar que el consumidor rechace el producto al abrir su envase (Day y col., 2008; Biji y col., 2015). Estos sistemas utilizan un mecanismo de transferencia de masa (Sajilata y col., 2007) y en general son películas, bolsitas, cintas, etiquetas o bandejas que se colocan dentro de los envases o se combinan con otros materiales permeables. Se han utilizado materiales porosos, tales como zeolitas, arcillas, carbón activado, maltodextrina y ciclodextrina. Los envases a prueba de olores se desarrollaron a base de tetraetilato de polietileno (PET) o polietileno de espesor adecuado junto con un orificio para permitir el paso de gases respiratorios y una bolsita hecha de una mezcla de carbón y níquel para absorber olores de frutas (Morris, 1999). Las aminas volátiles, tales como la trimetilamina, formadas por descomposición proteica en el músculo de los peces pueden eliminarse incorporando compuestos ácidos como el ácido cítrico o ácido ascórbico en polímeros (Franzetti y col., 2001; Vermeiren y col., 2003). Los materiales plásticos polares se pueden utilizar para prevenir la absorción de sabores con características no polares en los alimentos (Sajilata y col., 2007). En algunos productos, especialmente los alimentos ricos en grasa o los alimentos envasados al vacío, los olores desagradables se absorben durante el almacenamiento o distribución.

Los olores desagradables pueden evitarse mejorando las propiedades barrera de los materiales, por ejemplo combinando los materiales del envase con otros de alta barrera (como un recubrimiento de cloruro de polivinilideno (PVdC) sobre polipropileno orientado (OPP), metalización de aluminio sobre PET, mezcla de cera de abejas con polímeros comestibles) (Han y col., 2006). Otra tecnología innovadora para la mejora de las propiedades de barrera es la incorporación de nanopartículas dentro de los materiales poliméricos (López-Rubio y col., 2004).

Pero cabe resaltar que si bien se recomienda la eliminación de componentes malolientes para mejorar la calidad de los alimentos envasados, estas tecnologías no deben utilizarse para enmascarar los olores producidos por microorganismos peligrosos que podrían poner en riesgo a los consumidores (Brody y col., 2008).

1.3.7 Antioxidantes: La oxidación de los lípidos es, después del crecimiento microbiano, la principal causa de deterioro de los alimentos. En particular, los alimentos con alto contenido de lípidos, y especialmente aquellos con un alto grado de insaturación tales como frutos secos, aceites vegetales y de pescado, carne o productos pesqueros, son susceptibles al deterioro por oxidación. La oxidación de los lípidos en los productos alimenticios da como resultado el desarrollo de aromas típicos de la rancidez, haciendo el producto inaceptable para el consumo humano. Otros efectos negativos son la formación de aldehídos y la pérdida de calidad nutricional debido a la degradación de ácidos grasos poliinsaturados (relacionados con la prevención de enfermedades cardiovasculares) (Harris, 2007; Gómez-Estaca y col., 2014). Existen dos métodos de acción principales para los envases antioxidantes: la adición de antioxidantes a los alimentos o la eliminación de compuestos indeseables que puedan acelerar estas reacciones tales como oxígeno, radicales libres o iones metálicos del espacio de cabeza o de los alimentos.

La adición directa de compuestos antioxidantes a la superficie del alimento puede encontrarse con la limitación que una vez que los compuestos activos se consumen en la reacción, la protección cesa y la calidad de los alimentos se degrada a mayor velocidad (Mastromatteo y col., 2010). Además, puede afectar los parámetros de calidad de alimentos tales como color o sabor y, por otra parte, hay una preferencia del consumidor por la exclusión de aditivos en los alimentos. Por estas razones resulta particularmente interesante incorporar a estos compuestos antioxidantes en el envase. Incluso, estos compuestos también pueden estabilizar al polímero protegiendo a las películas de la

degradación térmica (Rooney, 2005). Se han añadido antioxidantes tales como butilhidroxitolueno (BHT) o butilhidroxianisol (BHA) a poliolefinas o polietileno de baja densidad que han demostrado ser efectivos para reducir la autoxidación lipídica en varios alimentos (Wessling y col., 1998; Torres-Arreola y col., 2007). Sin embargo, se cuestiona la presencia de los antioxidantes sintéticos en los alimentos, debido a los riesgos que puedan provocar en la salud de los consumidores. El enfoque alternativo que se está estudiando ampliamente es el uso de antioxidantes naturales como tocoferoles, extractos vegetales y aceites esenciales de hierbas y especias (Laitonjam, 2012). Asimismo, es importante mencionar el uso potencial de los residuos industriales de alimentos como fuente de agentes antioxidantes (Barbosa-Pereira y col., 2013; Cruz y col., 2004 y 2007). La incorporación de vitamina C y vitamina E en películas para envases ha podido reducir las reacciones oxidativas en pescados con alto contenido graso. La vitamina E también es segura y eficaz en productos con actividades acuosas bajas como cereales o productos tipo snack (Day, 2003) y ha demostrado ser estable bajo condiciones de procesamiento con excelente solubilidad en poliolefinas (Wessling y col., 1998; Vermeiren y col., 1999).

La selección adecuada del compuesto antioxidante a incorporar en la matriz polimérica es muy importante. El compuesto antioxidante y la matriz deben ser compatibles para lograr una distribución homogénea, y los coeficientes de partición del antioxidante en las diferentes fases deben favorecer su liberación al alimento o al espacio de cabeza. Una vez liberados, las características de solubilidad del antioxidante pueden determinar su eficacia, y por lo tanto el tipo de antioxidante debe seleccionarse en función del tipo de alimento. Los antioxidantes apolares parecen ser más adecuados para los alimentos con un alto contenido de lípidos y viceversa (Gómez-Estaca y col., 2014).

1.3.8 Antimicrobianos: El crecimiento microbiano acelera los cambios en el aroma, el color y la textura de los alimentos, resultando en la disminución de su vida útil y en el aumento del riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's). El desarrollo de envases antimicrobianos presenta un enfoque prometedor para reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos. Estos compuestos pueden estar presentes en el alimento envasado o en la matriz del envase (Kerry, 2014). Los envases antimicrobianos pueden clasificarse en dos tipos: los que contienen agentes antimicrobianos que migran hacia la superficie y aquellos que son eficaces contra microbios superficiales sin hacer necesaria la migración del agente activo a los alimentos (Han, 2000). Los compuestos

antimicrobianos pueden ser sintéticos o naturales. Aunque en muchos casos los compuestos sintéticos se utilizan en sus niveles permitidos, su aplicación plantea preocupaciones con respecto a la seguridad por parte de los consumidores debido al consumo de estos productos químicos. Así, la tendencia creciente es la aplicación de compuestos antimicrobianos de origen natural (Kapetanakou y col., 2016).

Las siguientes sustancias han sido utilizadas en envases alimentarios por sus propiedades antimicrobianas:

- Dióxido de cloro. Es un gas que penetra a través del envase. Tiene mayor eficacia antimicrobiana a pH neutro que el cloro e inhibe patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Es ampliamente eficaz contra los microorganismos, pero tiene efectos secundarios adversos, como el oscurecimiento del color de la carne y el blanqueo en verduras (Coma, 2008).

- Alcohol etílico. Su efecto fue descrito anteriormente como emisor de etanol (1.3.5).

- Óxidos metálicos. Los niveles nanométricos de óxidos metálicos como el óxido de magnesio y óxido de zinc están siendo explorados como materiales antimicrobianos para su uso en envases de alimentos.

- Iones de plata. Las sales de plata funcionan por contacto directo, pero migran lentamente y reaccionan preferentemente con productos orgánicos. Los iones de plata inhiben una amplia gama de enzimas y tienen una fuerte actividad antimicrobiana de amplio espectro, particularmente reducen el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos tales como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* en carne fresca (Realini y col., 2014). Algunos contenedores con nanopartículas de plata infundidas en materiales basados en polipropileno fueron efectivos para la inhibición del crecimiento de microorganismos (Duncan y col., 2011).

- Ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos como el ácido sórbico, el ácido benzoico, el ácido acético y el ácido propiónico son agentes antimicrobianos fuertes debido a su capacidad de alterar el transporte de membrana, la permeabilidad y reducir el pH intracelular. El ácido ascórbico y el ácido cítrico son ampliamente utilizados en productos frescos y jugos de frutas. Los ácidos láctico, tartárico, gálico y vanílico también han sido empleados como agentes conservantes (Moraes y col., 2007).

- Bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por microorganismos que inhiben otros microorganismos estrechamente relacionados. No son tóxicas, son termoestables, están comercialmente disponibles y son utilizadas para

aplicaciones específicas en una variedad de alimentos (Tajkarimi y col. 2010). La nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, es la más eficaz contra las bacterias Gram positivas. Actúa incorporándose en la membrana citoplasmática de las células objetivo y funciona mejor en condiciones ácidas. La natamicina y la pediocina también son utilizadas como agentes antimicrobianos.

- Aceites esenciales a base de especias. Han sido estudiadas diferentes aceites esenciales a base de especias para efectos antimicrobianos como el aceite esencial de orégano y limón, aceite de mostaza en pan, albahaca, clavo de olor, carvacol, timol y canela (Burt, 2004).

- Extractos naturales de especias como canela, pimienta de Jamaica, clavo, tomillo, romero, orégano y otros extractos vegetales como cebolla, ajo y rábano picante han sido estudiados como agentes antimicrobianos (Chi y col., 2006).

- Enzimas. Algunos envases antimicrobianos utilizan enzimas inmovilizadas como la lactoperoxidasa y lactoferrina para suprimir el crecimiento de microorganismos.

- Isotiocianato de alilo. Es un componente activo en wasabi, mostaza y rábano picante, es un amplio antimicrobiano y antimicótico. Sin embargo, tiene efectos adversos ya que provoca olores que afectan al alimento.

- Macromoléculas. Algunos polímeros como el quitosano son inherentemente antimicrobianos y se utilizan en películas y recubrimientos. Su modo de acción se mencionó anteriormente (I.3).

I.3.9 Envases con atmósferas modificadas (MAP): MAP puede extender la vida útil eliminando o reemplazando la atmósfera que rodea los productos alimenticios antes de ser envasados. Este método puede prolongar las condiciones de los productos alimenticios frescos y ha sido aplicado a productos alimenticios perecederos. Las altas concentraciones de O₂ favorecen los procesos oxidativos, que pueden modificar la calidad de los alimentos, mientras que la reducción de los niveles de O₂ retarda la velocidad de respiración, la producción de etileno, el pardeamiento enzimático y la actividad metabólica de los frutos. La respiración implica la oxidación de almidón, azúcar y ácidos orgánicos para producir moléculas más simples como CO₂, agua y calor. El CO₂ en envases impide el crecimiento de microorganismos y bacterias asociadas con el deterioro en productos cárnicos. Por estas razones, MAP puede extender la vida útil, reducir el crecimiento microbiano y conducir a envases sin olor o retrasar la maduración (Lee y col., 2014). Los gases más utilizados en MAP son oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono. Estos gases se utilizan individualmente

o combinados para mantener las características y calidad de los alimentos en la góndola. También se han utilizado otros gases como helio, óxido nitroso, ozono, neón, argón, óxido de etileno, dióxido de azufre y cloro. Varios estudios han demostrado la aplicación exitosa de MAP en productos como hortalizas frescas, frutas, carne y pescado (Oliveira y col., 2015; Belay y col., 2016; Saini y col., 2017).

1.3.10 Envases con auto-calentamiento (self-heating), auto-enfriamiento (self-cooling) y activos para microondas: Estos envases no tienen como finalidad prolongar la vida útil del alimento envasado sino que están orientados a generar situaciones de confort como son las comidas listas.

Un envase con auto-calentamiento es aquel que puede calentar el contenido del alimento sin fuentes de calor externas ni energía. Emplean óxido de calcio o magnesio y agua para generar una reacción exotérmica y se han utilizado para envases de café, raciones militares, etc. El dispositivo que induce el calentamiento ocupa una cantidad significativa de volumen dentro del envase (casi la mitad) (Lee y col., 2014). Algunos envases con auto-enfriamiento implican la evaporación de un compuesto externo que elimina el calor del contenido (normalmente el agua que se evapora y adsorbe sobre las superficies) (Brody y col., 2008).



Figura 1.3. A. Envases con auto-calentamiento (*self-heating*), B. con auto-enfriamiento (*self-cooling*) y C. activos para microondas.

Los envases activos para microondas están diseñados para mejorar el calentamiento de los alimentos mediante blindaje, modificación de campo y el uso de susceptores. El blindaje se puede aplicar para lograr un calentamiento más uniforme, diferencial y controlado de

diferentes porciones del alimento. Los modificadores para el calentamiento por microondas consisten en una serie de estructuras, que alteran la forma en que las microondas llegan a los alimentos dando como resultado un calentamiento uniforme y crujiente. Y los susceptores de microondas consisten en aluminio o acero inoxidable depositado sobre sustratos tales como películas de poliéster o cartón y sirven para secar, dejando un acabado crujiente en los productos (Realini y col., 2014; Biji y col., 2015). En la Figura 1.3 se muestran algunas imágenes de estos tipos de envases.

I.4 Envases inteligentes

Los envases inteligentes dan indicio de la calidad del producto; modifican las propiedades de permeación a gases del envase; proveen protección contra robo, falsificación y manipulación; y brindan mayor conveniencia al productor o consumidor (Ahvenainen, 2003; Kerry y col., 2006 y 2012). Estas tecnologías difieren entre sí en la formulación y metodología de obtención de los envases (*hardware*), en la cantidad y tipo de datos que se pueden transportar y en cómo se capturan y distribuyen los datos (Heising y col., 2014). Se clasifican en tres grupos principales:

(i) Indicadores: proveen información inmediata visual, cualitativa (o semi cuantitativa) acerca del alimento a través de un cambio de color, incremento en la intensidad de color o por difusión del colorante (Kerry y col., 2006). Existen dispositivos que indican la presencia o ausencia de alguna sustancia o reacciones entre dos o más sustancias con un cambio característico, usualmente cambios de color (Hogan y col., 2008). Informan acerca de un cambio ocurrido en el producto o su entorno (por ejemplo temperatura, pH) a través de cambios visuales (por ejemplo indicadores de tiempo-temperatura (TTI), indicadores de oxígeno, indicadores de confort e indicadores de frescura) (Lee y col., 2015; Ghaani y col., 2016).

(ii) Sensores: son dispositivos usados para detectar, localizar o cuantificar energía o materia, enviando una señal de detección o medida de una propiedad física o química que capta el dispositivo. Se utilizan para la detección de pequeñas moléculas de contaminantes alimentarias, patógenos, alérgenos o adulterantes en las matrices alimentarias (Ramos y col., 2015). Los sensores son más complejos que los indicadores ya que se componen de un receptor y un transductor. Los receptores transforman la señal química o física en energía, y el transductor convierte esa energía en una señal analítica (Ghaani y col., 2016). Comúnmente, existen sensores de gases (por ejemplo, para productos de la respiración de

frutos secos, metabolitos de microorganismos provenientes del deterioro, gases en el espacio de cabeza del envase) o bio-sensores (se utilizan por ejemplo en la detección de pesticidas en frutas y verduras) (Biji y col., 2015; Lee y col., 2015).

(iii) Portadores de datos: son dispositivos nuevos que proporcionan información o controlan el flujo de materiales, particularmente adecuados para grandes producciones, como cadenas de suministros. Comparados con los indicadores y sensores, estos no proveen información cuantitativa o cualitativa por ejemplo de la calidad del producto. Son usados para identificación, automatización, trazabilidad, prevención antirrobo o protección contra falsificación. Los dispositivos más importantes en la industria de envases son las etiquetas de radiofrecuencia (RFID), código de barras y código QR (Quick Response o "código de respuesta rápida") que pertenecen a la categoría de sistemas inteligentes que otorgan comodidad (Robertson, 2012; Ghaani y col., 2016).

A continuación se describen algunos ejemplos de envases inteligentes útiles en la industria alimentaria:

1.4.1 Indicadores de frescura y de deterioro microbiano: proporcionan información sobre la calidad del producto alimenticio a partir de cambios bioquímicos o por el crecimiento de microorganismos contaminantes. En la actualidad, la mayoría de los desarrollos en este campo, se basan en medir cambios en la composición de los gases en el envase como producto del metabolismo microbiano, o en la concentración de los mismos microorganismos contaminantes o de sus enzimas endógenas (Realini y col., 2014),

La mayoría de los conceptos se basan en un cambio de color de la etiqueta indicadora debido a la presencia de metabolitos derivados del crecimiento microbiano (Lee y col., 2015). Entre estos podemos citar indicadores basados en el cambio de pH debido a la producción de ciertos metabolitos específicos como n-butilato, ácido L-láctico, D-lactato y ácido acético (Kerry y col., 2006). Eagland y col. (2004) desarrollaron indicadores de pH incorporando una mezcla de indicadores universales en matrices sintéticas o de polivinilalcohol. Gorski y col. (2011) incluyeron diferentes indicadores ácido-base como azul de xilenol, púrpura de bromocresol, verde de bromocresol, rojo de cresol, fenolftaleína, azul de bromotimol, rojo neutro, p-naftolbenceína y combinaciones de ellos en películas de polietileno y las utilizaron para envasar pollo. Nerín de la Puerta y col. (2010) desarrollaron un soporte sólido adsorbente parcialmente polar (basado en papel o

cartón, aunque también utilizaron polipropileno) impregnado en una disolución de vainillina, capaz de pasar de incoloro a violeta al detectar cambios de pH en el alimento. Yoshida y col. (2014) desarrollaron un indicador de pH colorimétrico que consistía en una película de quitosano formulada con antocianinas.

Muchos metabolitos químicos volátiles producidos por actividad microbiana incluyendo diacetilo, aminas, dióxido de carbono, amonio y sulfuro de hidrógeno que aumentan su concentración durante el envejecimiento de los alimentos pueden ser fácilmente monitoreados por envases inteligentes indicando frescura (Arvanitoyannis y Stratakos, 2012; Koskela y col., 2015; Shukla y col., 2015). Morris y col. (2004) desarrollaron un indicador capaz de detectar cambios en los niveles de CO₂ del envase en una matriz de agar y silicona. Para ello utilizaron una mezcla de azul de bromotimol y naranja de metilo, el cual pasa de color verde a naranja cuando el pH disminuye por la presencia de CO₂ (producto del desarrollo microbiano). Existen algunos indicadores de dióxido de carbono que consisten en soluciones acuosas de quitosano o aislado proteico de suero de leche, cuya transparencia cambia dependiendo del pH debido a la presencia de CO₂ (Jung y col., 2012; Lee y Ko, 2014). Otros autores se han centrado en la detección de aminas volátiles, determinando el nitrógeno básico volátil total (NBVT) como indicadores de frescura en pescado, aves y carne (Kuswandi y col., 2012). Las aminas volátiles resultan de la degradación del óxido de trimetilamina y son responsables del olor y sabor en el pescado, comúnmente usado como criterio para evaluar su calidad. Boscher y col. (2014) describieron la detección de trimetilamina (TMA), trietilamina (TEA) y dimetilamina (DMA) usando un recubrimiento a base de metaloporfirina aplicado sobre películas de PET. Pacquit y col. (2007 y 2006) desarrollaron un indicador colorimétrico capaz de detectar el aumento de aminas volátiles como un indicador de deterioro de carne de pescado y lograron correlacionar la respuesta con el recuento total viable y el crecimiento de pseudomonas. Kuswandi y col. (2012 y 2014) también desarrollaron indicadores de aminas volátiles basados en películas de polianilina, membranas de celulosa y celulosa bacteriana aditivadas con rojo de metilo o curcumina, capaces de indicar deterioro en pescados.

El sulfuro de hidrógeno, que es liberado por la carne durante el envejecimiento por descomposición de cisteína, se correlaciona con el color de la mioglobina y es considerado un atributo de calidad para los productos cárnicos. Smolander y col. (2002 y 2008) desarrollaron un indicador de frescura con partículas de plata para carnes de aves de corral con atmósfera modificada.

Para el caso de frutas, se han desarrollado etiquetas que cambian de color indicando distintos estadios de la madurez. Funcionan a través de la reacción de los aromas liberados por el fruto a medida que madura (Fuertes y col., 2016). Todos los indicadores informados se basan en la detección de un único compuesto o parámetro, y tienen algunas limitaciones como la falta de especificidad con el riesgo de ofrecer falsos positivos o falsos negativos (Kerry y col., 2006; Kuswandi y col., 2011; Nopwinyuwong y col., 2010).

1.4.2 Indicadores de gases e indicadores de integridad: Los indicadores de concentración de gases monitorean los cambios en la atmósfera interna debido a los fenómenos de permeación a través del material de envasado, el metabolismo de los microorganismos y las reacciones enzimáticas o químicas en la matriz de los alimentos (Yam y col., 2005). Los indicadores de gas también se utilizan para evaluar la eficacia de los componentes activos del envase (por ejemplo, junto con los eliminadores de O₂ y de CO₂) o para detectar la aparición de fugas. La integridad del envase es un requisito esencial para el mantenimiento de la calidad y seguridad de los productos alimenticios en toda la cadena de producción y distribución (Vanderroost y col., 2014). Los indicadores de integridad más simples son indicadores de tiempo que proporcionan información sobre cuánto tiempo ha pasado desde que se ha abierto un producto. La etiqueta se activa en el momento del consumo, cuando el sello se rompe, dispara un temporizador y experimenta un cambio de color con el tiempo (Freshpoint, 2011; Insignia Technologies, 2014; Timestrip, 2012).

En particular, una fuga en un envase con atmósfera modificada significa un aumento considerable de la concentración de O₂ y una disminución de la concentración de CO₂, lo que podría producir un deterioro más rápido del alimento envasado. Por lo tanto, existen indicadores de fugas para MAP basados en detección de O₂ y CO₂ (Fuertes y col., 2016). Los indicadores de O₂ más comunes son indicadores colorimétricos basados en colorantes redox, tal como azul de metileno y un agente reductor fuerte, como glucosa en medio alcalino (Mills, 2005; Kuswandi y col., 2011). Cuando el colorante redox del indicador se oxida, se puede observar un cambio de color. Un inconveniente con este tipo de indicadores de O₂ es que el cambio de color es reversible y vuelve a su forma original si se reduce la concentración de oxígeno. Esto es indeseable para el control de fugas ya que el oxígeno que entra en el envase puede ser consumido debido al crecimiento microbiano. Lee y col. (2008) y Lawrie y col. (2013) desarrollaron indicadores de oxígeno activados con UV. Estos indicadores de oxígeno consisten en una tinta (compuesta por un

semiconductor, tal como TiO_2 , un indicador redox, tal como azul de metileno, un dador de electrones, tal como trietanolamina, y un polímero encapsulante tal como hidroxietil celulosa), que puede ser utilizada como recubrimiento o imprimirse posteriormente sobre una variedad de sustratos para producir una película azul indicadora de la concentración de oxígeno que, cuando se activa por luz UV, se vuelve incolora (Ghaani y col., 2016). También, existen sistemas de detección de oxígeno basados en enzimas oxidativas (Mattila y col., 1990; Gariol y col., 1996) que se pueden formular en pastillas (Ageless Eye, Mitsubishi Gas Chemicalcompany, 2014), como una capa impresa (EMKO packaging, 2013), o laminado en una película polimérica (Smolander y col., 1997, Fuertes y col.2016). Por su parte, los indicadores de CO_2 pueden ser clasificados en dos categorías: los basados en el cambio de color de un colorante indicador de pH (colorimétrico) y los basados en el cambio de fluorescencia inducido por CO_2 de un colorante luminiscente (Puligundla y col., 2012). Algunos de estos fueron descritos más detalladamente en la sección de indicadores de frescura (I.4.1).

1.4.3 Indicadores tiempo-temperatura (TTI): Los TTIs son dispositivos para monitorear, registrar y mostrar de forma acumulativa la influencia global de la historia térmica en la calidad del producto alimenticio desde su fabricación hasta su consumo (Dobroucka y col., 2014). Muestran cambios irreversibles en una característica física del indicador, generalmente color o forma, en respuesta a la historia térmica. Estos son de gran interés cuando los alimentos necesitan ser almacenados bajo condiciones específicas tales como calor o congelación. En el caso de alimentos que no deben congelarse, un TTI indicaría si el alimento ha sido expuesto incorrectamente a bajas temperaturas. A la inversa, un TTI podría especificar si los alimentos sensibles al calor habrían estado expuestos a altas temperaturas anormalmente e incluso el tiempo de exposición (Fuertes y col., 2016).

Los TTI pueden clasificarse como indicadores de historia parcial o indicadores de historia completa dependiendo de su mecanismo de respuesta. Los indicadores de historia parcial no responden a menos que se haya excedido un umbral de temperatura e indican que un producto ha sido expuesto a una temperatura suficiente para causar un cambio en la calidad o seguridad del producto. Los TTI que informan sobre la historia completa dan una respuesta continua dependiente de la temperatura a lo largo de la trazabilidad de los productos y constituyen el principal foco de interés para la investigación y la explotación comercial (Kerry y col., 2006). Un requisito previo para la implementación efectiva de un

TTI es el estudio cinético y el modelado de las relaciones entre pérdidas calidad del alimento y la respuesta.

Hay TTI que actúan con diferentes mecanismos, están basados en principios químicos, físicos y biológicos. Para la respuesta química o física, se basan en una reacción química o un cambio físico en el tiempo y la temperatura, tales como una reacción ácido-base, la fusión, la polimerización, etc. Wanihsuksombat y col. (2010) desarrollaron TTI basados en ácido láctico para el control de calidad de productos alimenticios. Los cambios de color (de verde a rojo) asociados con la difusión de ácido láctico se produjeron de forma clara y progresiva debido a la reducción del pH. También se desarrolló un TTI que contenía un éster de ácido graso con un punto de fusión específico mezclado con un colorante azul. Al exponerse a una temperatura que excede un valor crítico, la sustancia se funde y a través del indicador provoca la aparición de una coloración azul (3M, 2014; Kerry y col., 2006; Kuswandi y col., 2011). También se han desarrollado TTI en base a la formación de un polímero coloreado cuando la reacción de polimerización se ve favorecida por el incremento de la temperatura (Kerry y col., 2006, Temptime Corporation, 2014). Los que están basados en la respuesta biológica, se basan en el cambio en la actividad biológica, como microorganismos, esporas o enzimas (Kuswandi y col., 2009). VITSAB es un TTI compuesto que tiene dos compartimentos separados que contienen una solución acuosa de una enzima lipolítica y el sustrato que consiste principalmente en triglicéridos y un indicador de pH. Este TTI se activa cuando la pared entre los dos compartimentos se rompe, el contenido se mezcla y se produce un cambio de color de verde a amarillo claro debido a la hidrólisis enzimática del sustrato (Galagan y Su, 2008; VITSAB, 2013). TopCryo™ es un sistema TTI basado en la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum* y un indicador que modifica su color (fucsina ácida). Los microorganismos, el indicador y un medio nutritivo se incorporan en una bolsa de plástico multicapa pegada sobre la capa exterior del envase del alimento.

Por lo general, los TTI consisten en pequeñas etiquetas autoadhesivas unidas a envases individuales o configuraciones más grandes (por ejemplo, contenedores) (Ghaani y col., 2016).

I.4.4 Indicadores de abuso térmico y de confort (uso de tintas termocrómicas): La tinta termocrómica es una tinta dinámica especializada que cambia de color con la exposición a diferentes temperaturas. Las temperaturas de activación de las tintas termocrómicas van

desde temperaturas bajas de refrigeración, pasando por la temperatura del cuerpo humano hasta altas temperaturas que superan el umbral de dolor:

- *tintas termocrómicas activadas por el frío*, se utilizan en etiquetas y envases para crear un cambio de color cuando se enfría.
- *tintas termocrómicas activadas al tacto*: se tornan transparente cuando se frota o se toca para revelar una imagen u otro color impreso debajo.
- *tintas de cristal líquido* activadas al tacto, cambia de color dentro del espectro visible cuando se frota o se toca.
- *tintas termocrómica de alta temperatura*, están diseñadas para cambiar el color justo por debajo del umbral del dolor, alertando a los consumidores y usuarios de un peligro en la seguridad del producto (Vanderroost y col., 2014).

El cambio de color de las tintas termocrómicas puede ser irreversible o reversible. Las tintas termocrómicas irreversibles no poseen color hasta que se exponen a una cierta temperatura a la que se desarrolla un color intenso. Una vez que se alcanza este color se mantendrá constante o cambiará dejando una modificación permanente indicando un cambio de temperatura (Roya y col., 2016). Estas tintas termocrómicas irreversibles se utilizan en la elaboración de indicadores de abuso térmico, para evidenciar que la temperatura de almacenamiento de un producto superó un valor recomendado, por ejemplo que se rompió la cadena de frío en un producto refrigerado. En este caso se puede considerar como un tipo TTI de historia térmica parcial.

Por otra parte, las tintas termocrómicas reversibles cambian el color cuando se calientan y vuelven al color original cuando la temperatura disminuye o viceversa. Estas tintas termocrómicas reversibles se emplean para indicar situaciones de confort, por ejemplo, para asegurar a los consumidores que una bebida en un recipiente está perfectamente refrigerada o para alertar a los consumidores de que un envase en el microondas ha alcanzado la temperatura deseada o está demasiado caliente (Vanderroost y col ., 2014).

I.4.5 Biosensores: Se utilizan para detectar, registrar y transmitir información relativa a reacciones biológicas (Yam y col., 2005). Los biosensores contienen bioreceptores y transductores (Alocilja y Radke, 2003). El biorreceptor reconoce el analito deseado y el transductor convierte las señales bioquímicas en una respuesta electrónica cuantificable (Yam y col., 2005). Los bioreceptores pueden ser materiales orgánicos o biológicos como

enzimas, hormonas, ácidos nucleicos, antígenos, microorganismos, etc. Los transductores pueden ser ópticos, acústicos o electroquímicos. Por ejemplo, Food Sentinel System (SIRA Technologies Inc.) es un biosensor comercial desarrollado para detectar patógenos alimentarios con un anticuerpo específico de patógenos unido a una membrana que forma parte de un código de barras. Los patógenos forman una banda de coloración oscura que hace que el código de barras no pueda ser leído (Yam y col., 2005). ToxinGuard® (Toxin Alert, Canadá) es un sistema de diagnóstico visual basado en anticuerpos impresos en un material de envasado plástico basado en polietileno que detecta los patógenos específicos como *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *E coli.*, *Listeria spp.* (Bodenhamer y col., 2004). Pospiskova y col. (2013) desarrollaron un biosensor para la detección de aminas biogénicas formadas debido a la descarboxilación de aminoácidos o por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas debido a la acción microbiana. Arvanitoyannis y Stratakos (2012) desarrollaron biosensores para la detección de xantina (producto de degradación de nucleótidos de adenina en tejido animal) mediante la inmovilización de óxido de xantina sobre electrodos hechos de materiales tales como platino, plata y grafito. También se han utilizado sensores de gases para detectar la presencia de analitos gaseosos en el envase. Incluyendo sensores de oxígeno, sensores de dióxido de carbono, sensores de vapor de agua, sensores de etanol, transistores de efecto de campo de semiconductor de óxido metálico, polímeros orgánicos conductores, sensores de cristal piezoeléctricos, etc. (Kerry y col., 2006; Ghaani y col., 2016). Se han desarrollado sensores ópticos de oxígeno basados en el principio de la disminución de la intensidad de la fluorescencia o en cambios de absorbancia causados por el contacto directo con el analito (Papkovsky y col., 2002). Von Bültzingslowen y col. (2002) desarrollaron un sensor óptico para medir el dióxido de carbono basado en el indicador de pH fluorescente 1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfonato (HPTS) inmovilizado en una matriz de sílice modificada e hidrófoba.

El advenimiento de la nanotecnología ha revolucionado el campo de acción, y se han desarrollado nanobiosensores para detección de patógenos, contaminantes químicos, deterioro, el manipuleo de productos, seguimiento de ingredientes o productos a través del procesamiento (Liu y col., 2007).

1.4.6 Narices y lenguas electrónicas: Estos sistemas consisten en una serie de sensores que son extremadamente sensibles a los productos liberados por los alimentos cuando estos se deterioran. Específicamente, las narices electrónicas interactúan con compuestos

volátiles presentes en el espacio de cabeza del envase, mientras que las lenguas electrónicas reaccionan con compuestos no volátiles en un líquido. Estos instrumentos podrían colocarse en envase para proporcionar datos sobre controles de calidad y seguridad (Baldwin y col., 2011). La tecnología de nariz electrónica se ha empleado con éxito para detectar la madurez de los frutos; por ejemplo el producto comercial "ripeSense" inicialmente es de coloración roja y se gradúa en naranja y finalmente a amarillo. Al ver el color del sensor, los consumidores eligen la fruta en su madurez preferida (Kuswandi y col., 2009). En cuanto a las lenguas electrónicas, se puede encontrar una amplia gama de aplicaciones para distintos productos alimenticios como, vinos (Wei y col., 2011), jugos de frutas (Ciosek y col., 2006), el contenido graso en la leche (Lawton y Pethig, 1993), o muestras de agua (Ghaani y col., 2016).

1.4.7 Identificadores de radio frecuencia (RFID): Las etiquetas RFID utilizan campos electromagnéticos de radiofrecuencia para almacenar y comunicar información en tiempo real del producto para su identificación y trazabilidad (Lee y Rahman, 2014). Las etiquetas consisten en un circuito integrado conectado a una antena para la transmisión de información almacenada en el chip a un lector. Las principales ventajas de la RFID sobre los "códigos de barras" son que permiten un mando a distancia, múltiples elementos pueden ser monitoreados al mismo tiempo y tienen capacidad para almacenar diversa información (origen, parámetros del proceso, Información comercial, etc.) permitiendo una identificación única del producto (Kuswandi y col., 2011). Hay muchas empresas que fabrican etiquetas RFID, y se han utilizado durante años en productos de alto valor, como la electrónica o la ropa (Lagaron y col., 2014). En la industria alimentaria, estos dispositivos pueden acoplarse a un contenedor o caja y, por tanto, pueden identificarse y rastrearse. Hay una serie de proveedores de RFID como EPSILIA (Canadá), RFID Enabled Solutions Inc. (EE.UU.) y HRAFN Ltd. (Suecia), que han trabajado junto con las industrias de carne y pescado para implementar sistemas RFID (Fuertes y col. 2016). Los sistemas RFID más evolucionados permiten la integración de otras funciones en la etiqueta, como indicadores de tiempo-temperatura o biosensores, para monitorear y comunicar la historia térmica del producto, así como dar información sobre la calidad (Guillory y Standhardt, 2012). Se han realizado numerosos avances en este campo, como el desarrollo de un sensor de pH incorporado en un transmisor de radiofrecuencia sin pilas, para el monitoreo *in situ* de los procesos de deterioro de los productos pesqueros (Huang y col., 2012); etiquetas RFID

para controlar la frescura de la carne (Eom y col., 2014); etiquetas RFID con indicador óptico de oxígeno para su uso en MAP (Martínez-Olmos y col., 2013); sensores para la frescura de carne de cerdo (Sen y col., 2013); etiquetas RFID con sensores capaces de medir la temperatura, la humedad y la presencia de compuestos amino volátiles, para estimar la frescura del bacalao (Smits y col., 2012); etiquetas RFID con sensores CO₂ y O₂ para el control de la frescura de los vegetales (Eom y col., 2012); etiquetas RFID para controlar la frescura de la leche envasada (Potyrailo y col., 2012).

En la Figura I.4 se muestran algunos envases inteligentes que se encuentran en el mercado actual y en la Figura 1.5. se sintetizan los distintos tipos de materiales activos e inteligentes.



Figura I.4. Ejemplos de envases inteligentes que se encuentran en el mercado: **a)** Indicador tiempo temperatura OnVu™ por Freshpoint (Switzerland)); **b)** indicador de tinta termocrómica para bebidas frías; **c)** Indicador para detectar la madurez de los frutos por RipeSense; **d)** Sensor de etanol que vía RFID informa el deterioro del alimento (VTT Technical Research Centre of Finland); **e)** Indicador tiempo temperatura vía RFID por Thinfilm.

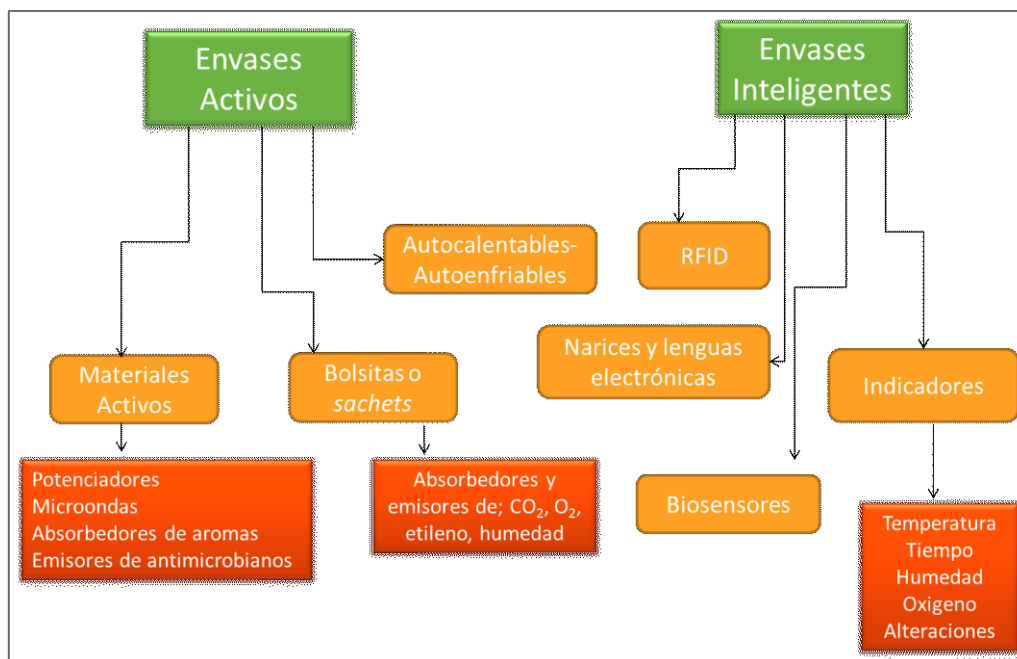


Figura I.5. Clasificación de envases activos e inteligentes para alimentos.

I.5. Mercado actual y proyecciones de los envases activos e inteligentes

La creciente demanda de envases para alimentos frescos y de calidad, la comodidad del consumidor y la preocupación de los fabricantes por una mayor vida útil de los productos alimenticios están impulsando el desarrollo de envases activos e inteligentes para la industria de alimentos y bebidas, que se encuentra aumentando constantemente (Lee y col., 2014; Fuertes y col., 2016).

Actualmente se estima que dentro del mercado global, el 66% de los envases “*smart*” corresponde a los envases activos (incluyendo en este número a los envases con atmósfera modificada MAP) y el 34% restante corresponde a los envases inteligentes (Grand View Research, Inc). En términos de ingresos, el mercado global de “*smart packaging*” fue de U\$S 10.800 millones en 2015 y se espera que alcance U\$S 26.700 millones en 2024, registrando una tasa de crecimiento anual compuesta (TCAC) de 10,6% de 2016 a 2024, (Grand View Research, Inc). Se prevé que la demanda de envases activos crecerá un 5,4% anual lo que significará U\$S 2.500 millones en 2019. Esta demanda está impulsada por el crecimiento de los productos eliminadores de gases (como los eliminadores de humedad y oxígeno), que se benefician del desarrollo de tecnologías avanzadas y por la preferencia de los consumidores por los alimentos con menos aditivos. También se anticipa un crecimiento rápido de una pequeña parte los envases antimicrobianos, estimulado por los progresos tecnológicos aunque los factores de costo y

rendimiento tenderán a inhibir su amplio uso. Mientras que el crecimiento en la demanda de desecantes y los susceptores de microondas se supone que registrarán ganancias moderadas debido a la madurez del mercado (Freedonia Group Inc., Realini y col., 2014).

En cuanto a los envases inteligentes, su demanda tendrá un crecimiento más rápido, llegando a U\$S 15.000 millones en 2019 en productos como los indicadores de tiempo-temperatura y los RFID. Si bien muchos de estos productos han sido considerados innecesarios, el desarrollo de tecnología que permite la producción de la electrónica a bajo costo, el desarrollo de sensores y la eliminación de lectores electrónicos especializados a favor de los teléfonos inteligentes (adopción de los códigos QR) les permitirá ingresar en esta tendencia (Freedonia Group Inc.; Fuertes y col., 2016).

I.6. Bioplásticos

Los problemas ambientales provocados por la producción y acumulación de plásticos sintéticos, así como la naturaleza no renovable del petróleo motivan la demanda de materiales biodegradables y derivados de fuentes renovables (Vieira y col., 2011).

Los **bioplásticos** poseen al menos alguna de estas características: son biodegradables y / o se obtienen a partir de fuentes renovables. La "Sociedad Americana de Ensayos y Materiales" ("American Society of Testing and Materials") (ASTM) define un material biodegradable como un compuesto que "puede ser degradado en dióxido de carbono, metano, componentes inorgánicos o biomasa, por la actividad enzimática de microorganismos y puede ser medido por ensayos estándar sobre un determinado período de tiempo" (ASTM D6400-99, 2002).

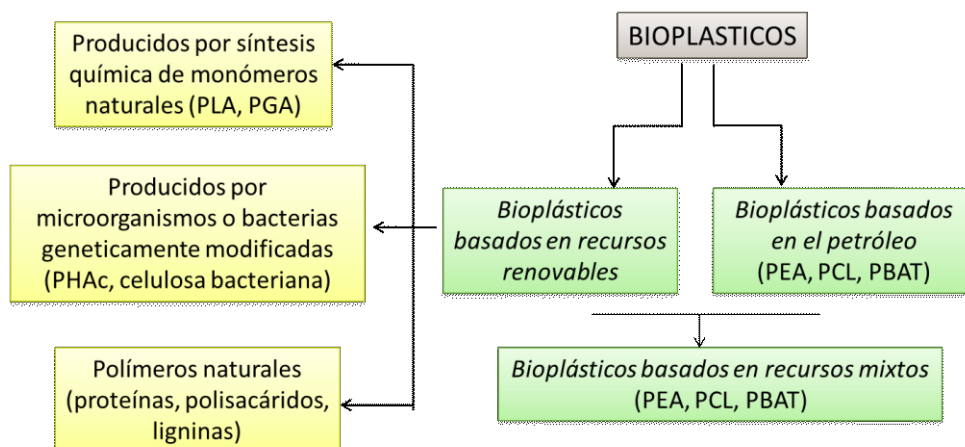


Figura I.6: Clasificación de los bioplásticos según su origen y el método de obtención (Condés y col., 2016).

Basándose en su origen, los bioplásticos pueden clasificarse en tres grupos (Figura I.6) (Reddy y col., 2013; Condes y col., 2016):

i) Bioplásticos basados en recursos renovables: aquellos que se sintetizan en forma natural por las plantas y los animales y los microorganismos, o que son totalmente sintetizados a partir de recursos renovables por métodos químicos.

ii) Bioplásticos basados en el petróleo: estos polímeros se sintetizan a partir de recursos del petróleo, pero son biodegradables. Algunos ejemplos son la policaprolactona (PCL) y el poli-(adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT).

iii) Bioplásticos basados en recursos mixtos: estos están preparados a partir de combinaciones de monómeros de base biológica o derivados del petróleo; incluyen polímeros tales como poli-(tereftalato de trimetileno) (PTT), biomateriales termoestables y mezclas de base biológica (Condes y col., 2016).

El hecho de que un material se obtenga de recursos renovables no implica necesariamente que sea biodegradable, y viceversa. La combinación de ambas características la cumplen los bioplásticos basados en recursos renovables, y por eso resultan tan interesantes de estudiar. Estos pueden clasificarse en tres categorías según el método de producción (Figura I.6) (van Tuil y col., 2000):

- *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, producido por la fermentación de carbohidratos y 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; aunque, el nivel de producción industrial tiene un alto costo comparado con los materiales termoplásticos más usados (Bohlmann, 2007).

- *Polímeros producidos por microorganismos silvestres o por bacterias genéticamente modificadas:* este grupo está constituido por 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 polihidroxibutiratos (PHB). Existen otros polímeros producidos por microorganismos que se están estudiando

actualmente, como la celulosa bacteriana, entre otros. Cabe destacar que los costos de producción de estos polímeros son todavía elevados.

- *Biopolímeros naturales*: Esta clase de biopolímeros incluye polisacáridos (derivados de celulosa, alginato, pectinas, almidones, quitosano, carragenano, agar y gomas), ligninas y proteínas de origen animal o vegetal (proteína de soja, gluten de trigo, zeína, gelatina, suero, caseína y queratina entre otros). Todos estos compuestos contienen enlaces hidrolizables, una propiedad que los hace muy susceptibles a la biodegradación por enzimas hidrolíticas de los microorganismos. Esta característica tiene un gran impacto en el rendimiento y la durabilidad de estos materiales cuando se almacena en condiciones de alta humedad (Condes y col., 2016).

I.7 Materiales proteicos

1.7.1 Características de los materiales proteicos

En las últimas décadas, numerosas proteínas de origen animal, tales como: caseínas, proteínas del suero de leche, albúminas, colágeno, gelatina, queratina y proteínas miofibrilares; así como también proteínas vegetales: soja, gluten de trigo, zeínas, girasol, algodón, amaranto, maní, arroz, arveja, sorgo, pistacho y lupino, han sido estudiadas por su capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables (Krochta, 1997; Cuq y col., 1998; Gennadios, 2002; Bourtoom, 2009; Gómez-Guillén y col., 2009; Zhang y Mittal, 2010; Song y col., 2011; Wang y col., 2015; Ortiz y col., 2017; Salgado, 2010; Condés 2013). De todas ellas, las que poseen menor costo de producción por ser extraídas de recursos agropecuarios renovables o de subproductos industriales (como la zeína del maíz en la producción de etanol, las proteínas de soja y girasol residuales en la extracción de aceite y la gelatina proveniente de residuos pesqueros y de mataderos) son las que presentan mayor atractivo en el desarrollo de materiales biodegradables.

Las películas a base de proteínas se pueden preparar mediante dos tipos de tecnologías: un "proceso húmedo" basado en la disolución o dispersión de proteínas o un "proceso seco" basado en las propiedades termoplásticas de las proteínas en condiciones de baja hidratación (Cuq y col., 1998). Independientemente de la técnica de procesamiento utilizada, el material proteico resultante es una red tridimensional reorganizada, con bajo contenido de agua, donde las interacciones entre proteínas y otros componentes de la formulación están favorecidas. El tipo y número de interacciones implicadas en la estabilización de la matriz proteica (enlaces disulfuro y puentes de hidrógeno además de

las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) están determinadas por la composición aminoacídica y el peso molecular de las proteínas -que varían significativamente dependiendo de su origen-, su grado de desnaturalización, las condiciones de procesamiento implicadas en la preparación del material, y los aditivos utilizados. Todas estas condiciones determinan el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrófilo-hidrofóbico de la red de proteínas resultante y se verán reflejadas en sus propiedades mecánicas, de barrera y su susceptibilidad al agua (Gennadios, 2002; Mauri y Añón, 2012). En general las películas proteicas presentan excelentes propiedades de barrera a gases -en particular al oxígeno-, a los lípidos y a los aromas; propiedades mecánicas moderadas, pero comúnmente muestran alta permeabilidad al vapor de agua (WVP) debido al carácter hidrofílico de las proteínas (Gennadios, 2002).

Las propiedades de barrera al agua, gases, sabores, aromas, radiación y lípidos son de particular interés en el envasado de alimentos. En materiales basados en proteínas estas propiedades dependen de la naturaleza y densidad de la red macromolecular y más particularmente de la proporción y distribución de los aminoácidos polares respecto a los no polares (Cuq y col., 1996). En general, la permeabilidad de los materiales proteicos aumenta con la temperatura y la humedad relativa del ambiente, por lo que las propiedades de barrera de una película de proteína sólo pueden compararse en idénticas condiciones de medición (Gennadios, 2002). Las películas proteicas, debido a su naturaleza polar e hidrofílica inherentes, exhiben una alta permeabilidad al vapor de agua (WVP), superior a la de los polímeros sintéticos ampliamente utilizados y similar a las de las películas formadas con polisacáridos (McHugh y Krochta, 1994). Por lo tanto, estas películas pueden usarse como barreras protectoras frente al intercambio de humedad durante períodos cortos o en alimentos de bajo contenido de agua. También podrían utilizarse con otros tipos de productos alimenticios, con alto contenido de agua, cuyo envasado requiere películas que sean altamente permeables al vapor de agua (Gennadios y col., 1993). En este sentido, entre las matrices de proteínas vegetales, las de triticale y proteínas de amaranto forman películas con las WVP más bajas (Aguirre y col., 2013; Condés, 2013).

La permeabilidad de los materiales en base de proteínas frente a los gases (oxígeno, dióxido de carbono y etileno) bajo condiciones de humedad relativa baja e intermedia es considerablemente menor que la informada para las películas sintéticas de LDPE y HDPE (Guilbert y Cuq, 2005). La baja permeabilidad al oxígeno resulta especialmente interesante

para la protección de alimentos susceptibles a la oxidación de lípidos (Kester y Fennema, 1986). Pero en estos materiales, estas propiedades son muy dependientes de la temperatura y la humedad del ambiente (Cisneros-Zeballos y Krochta, 2005), lo que debe considerarse al analizar cualquier aplicación. Por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono a altas humedades relativas (HR) puede llegar a ser aproximadamente mil veces mayor que cuando se almacenan a 0% de HR. En los materiales proteicos, este efecto es mucho mayor para los gases “hidrofílicos” (como el CO₂) que para los “hidrofóbicos” (como el O₂) (Guilbert y Cuq, 2005). Esta permeabilidad diferencial resulta en consecuencia en un aumento en el coeficiente de selectividad para estos dos gases (CO₂/O₂) con la temperatura y la humedad relativa, que se debe tener en cuenta al diseñar envases para alimentos en atmósferas modificadas o al usar estas formulaciones proteicas como recubrimientos comestibles. Las atmósferas bajas en O₂ y altas en CO₂ se han utilizado para extender la vida útil de frutas y hortalizas frescas retardando la respiración, la transpiración del producto y la producción de etileno y también se ha demostrado que controlan efectivamente el pardeamiento enzimático, la pérdida de firmeza y el deterioro de esos productos (Rojas-Graü y col., 2009).

Del mismo modo, debido a su naturaleza hidrófila, las películas proteicas poseen excelentes propiedades de barrera con respecto a los aromas y aceites (Miller y Krochta, 1997; Trezza y Vergano, 1994), una característica extremadamente útil para el envasado de alimentos listos para el consumo o para productos que sean sometidos a la fritura. El recubrimiento proteico puede disminuir la absorción de aceite durante la fritura, reduciendo así el contenido lipídico y las calorías, mejorando la calidad nutricional del alimento frito (Mallikarjunan y col., 1997; Albert y Mittal, 2002; Varela y Fiszman, 2011).

En general, las películas proteicas muestran menores valores de tensión a la rotura y elongación que las películas sintéticas (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008). Pero su comportamiento mecánico es suficiente para permitir su uso en diversas aplicaciones tales como recubrimientos o envases (Krochta, 2002). La formación de películas y recubrimientos proteicos requiere de la adición de un plastificante para reducir las fuertes interacciones entre las cadenas polipeptídicas y así disminuir la fragilidad del material, aumentar su flexibilidad y permitir su manipulación (Sothornvit y Krochta, 2005). En estas películas las propiedades mecánicas están influenciadas por la distribución e intensidad de las interacciones inter e intramoleculares generadas en la formación de la red tridimensional (Guilbert y Cuq, 2005), que varía según el grado de desnaturalización que

presentan las proteínas constituyentes antes de formar la película. El desplegamiento de las cadenas peptídicas, favorece el entrecruzamiento durante la formación de los materiales (Hoque y col., 2010). Así es que, películas producidas a partir de proteínas de soja completamente desnaturalizadas -estabilizadas principalmente mediante puentes disulfuro- presentaron mayor resistencia mecánica que las formadas a partir de proteínas que conservaban su estructura nativa o las formadas por girasol parcialmente desnaturalizadas- estabilizadas principalmente por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas- (Denavi y col., 2009; Salgado y col., 2010).

La solubilidad es otra propiedad importante que define la posterior aplicación de las películas. En el caso de proteínas las películas pueden ser prácticamente insolubles (como en el caso de zeínas y gluten) o totalmente solubles (como las formadas por proteínas globulares nativas, como las de suero de leche).

Así por ejemplo, una solubilidad o la sensibilidad al agua altas puede ser una ventaja, por ejemplo, en la formulación de *sachets* de disolución rápida para alimentos instantáneos, o en el desarrollo de un material activo en el que la capacidad de hidratación en agua se utilice para inducir un cambio drástico en las propiedades del material asociado o para la liberación de algún compuesto activo (Ortiz y col., 2013; Janjarasskul y Krochta, 2010). En contraposición, si se requiere la integridad de la película para proteger un alimento, o se lo requiere para trabajar en condiciones de alta humedad relativa, su alta sensibilidad al agua resultará inadecuada para esa función (Gennadios, 2002).

1.7.2 Estrategias para mejorar la funcionalidad de los materiales proteicos

Se han realizado numerosas investigaciones para mejorar la funcionalidad de los materiales proteicos. Se ha tenido especial interés en mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera con el fin de ampliar sus aplicaciones, ya sea para reemplazar los polímeros sintéticos dentro de sus propios campos de uso o para buscar nuevos papeles más específicos e innovadores. Estas investigaciones han seguido distintas estrategias detalladas a continuación.

1.7.2.1 Aplicación de tratamientos físicos y / o químicos

Como se mencionó anteriormente, la estructura proteica influye en el tipo de interacciones y en el grado de entrecruzamiento de los materiales finales. En general, un aumento en estas interacciones produce matrices más densas con menores solubilidades

en agua y mayores resistencias mecánicas, mientras que los tipos de interacciones implicadas en la estabilización de la matriz influyen en la magnitud del cambio en cada propiedad (Mauri y Añón, 2006 y 2008; Salgado y col., 2010). Diferentes dispersiones filmogénicas preparadas con proteínas de soja, amaranto, gluten, maní y otras fuentes se han sometido a procesos de calentamiento, han sido tratadas con ácidos o bases, se han hidrolizado o se han expuesto a alta presión o irradiación antes de comenzar el proceso de formación de la película (Condés y col., 2012 y 2013; Guerrero y de la Caba, 2010; Mauri y col., 2006). Estas intervenciones produjeron cambios en la estructura inicial de las proteínas que se vieron mayormente reflejadas en las propiedades mecánicas y la solubilidad en agua y en menor medida en su permeabilidad al vapor de agua. Las mejoras más significativas se produjeron cuando se favoreció la formación de puentes disulfuro en la estabilización de las matrices proteicas.

Las metodologías de procesamiento utilizadas en la formación de materiales proteicos, al igual que las variables de procesamiento, pueden dar lugar a productos con propiedades diferentes. Así, por ejemplo, las condiciones de secado utilizadas (como temperatura, humedad relativa) para obtener películas de proteína de soja por *casting*, *spreadcoating* o termocompresión terminan influenciando las propiedades mecánicas, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de los materiales resultantes (Denavi y col., 2009; Foulk y Bunn, 2001; Ortiz y col., 2017). En el procesamiento de proteínas por extrusión los parámetros más influyentes para modificar la estructura proteica resultante son la temperatura y la fuerza de cizalla. Estas variables producen una reestructuración importante del material a través del despliegue de las cadenas polipeptídicas, como consecuencia de la tensión mecánica y su elevada velocidad de reacción a altas temperaturas (Kumari y col., 2010; Wang y col., 2003).

La aplicación de tratamientos físicos y químicos posteriores a la formación de las películas también se utilizan para modificar las propiedades de los materiales resultantes. El curado (tratamiento térmico) aplicado luego de la formación de las películas afecta notablemente a sus propiedades, en general, aumenta la resistencia a la tracción y la coloración, mientras que al mismo tiempo disminuye la elongación, el contenido de humedad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas (Gennadios y col., 1996; Liu y col., 2004; Micard y col., 2000; Rhim y col., 1999). La radiación ultravioleta y gamma puede afectar a las proteínas de las películas mediante cambios conformacionales, la oxidación de aminoácidos, la ruptura de los enlaces covalentes, la formación de radicales libres y la

generación de reacciones de recombinación y polimerización (Bourtoom, 2009; Rhim y col., 1999). En este sentido, Lee y col. (2004 y 2005) utilizando rayos gamma, y Gennadios y col. (1998) empleando luz ultravioleta lograron mejorar la resistencia a la tracción de películas en base a proteínas de soja.

I.7.2.2 Incorporación de aditivos

Una de las ventajas de las películas y recubrimientos formados por proteínas es que pueden incorporar aditivos en su matriz para mejorar su funcionalidad. Esto puede incluir aditivos capaces de:

1. mejorar o modificar la funcionalidad básica de los materiales; como plastificantes, emulsionantes y agentes entrecruzantes.

2. mejorar la funcionalidad del material aumentando la calidad, estabilidad y seguridad del producto que protege la película o el recubrimiento. En el caso de materiales para envases de alimentos son especialmente interesantes los agentes antioxidantes, antimicrobianos, nutracéuticos, sabores y/o colorantes (Han, 2005).

Los primeros aditivos se incorporan para modificar el mecanismo de formación de la película. Para ello, en la mayoría de las investigaciones, plastificantes hidrófilos de bajo peso molecular (por ejemplo, glicerol, sorbitol, azúcares simples y otros polioles, etilenglicol y etanolamina y sus respectivos derivados) se han añadido a las formulaciones en base a proteínas vegetales (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008; Song y col., 2011; Vieira y col., 2011). Se encontró que las propiedades físicas de las películas estaban fuertemente influenciadas por el tipo y la cantidad de plastificante utilizado. La adición de estos compuestos -usualmente en concentraciones que varían entre 15 y 40% del peso del biopolímero en la matriz- aumentó la elongación de las películas; pero también provocó una disminución en la tensión a la rotura de la película y su capacidad para actuar como barrera al agua, al oxígeno, aromas y aceites, y la humedad ambiente (Vanin y col., 2005). También se ha investigado la inclusión de plastificantes hidrófobos, como ésteres de citrato como alternativa para reducir estos inconvenientes mencionados (Andreuccetti y col., 2009). La adición de esta clase de plastificantes también provoca una disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) e influye en las propiedades viscoelásticas y de fluidez de las dispersiones filmogénicas. Con la combinación de plastificantes y temperatura elevada, las proteínas pasan a través de la transición vítrea formando una masa gomosa a la que se le puede dar forma y estabilizarse por enfriamiento y/o

eliminación de plastificantes volátiles. La selección correcta de los plastificantes adecuados requiere consideraciones en cuestiones a la compatibilidad, eficiencia, permanencia y costo del plastificante para optimizar las propiedades mecánicas de una película dada con un mínimo incremento en su permeabilidad (Sothornvit y Krochta, 2005).

Los emulsionantes son compuestos anfífilos que, además de tener el papel de plastificantes, pueden modificar la energía superficial para controlar la adhesión y la humectabilidad de las superficies (Krochta, 2002). Algunos han sido ampliamente utilizados en la industria alimentaria para desarrollar películas de origen vegetal: Tweens, Spans, sales de ácidos grasos y fosfolípidos como la lecitina (Andreuccetti y col., 2010 y 2011).

Otra estrategia consiste en utilizar agentes entrecruzantes químicos (generalmente aldehídos de bajo peso molecular, como formaldehído, glioxal y glutaraldehído) que reaccionan con grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas para formar enlaces covalentes intra e intermoleculares. Pero como los aldehídos son potencialmente tóxicos, su uso se limita a aplicaciones no alimentarias. En contraste, el entrecruzamiento causado por enzimas como la transglutaminasa, la lipoxidasa, la lisiloxidasa, la polifenoloxidasa y la peroxidasa, no presenta estas restricciones y ofrece un mayor abanico de aplicaciones en general (Stuchell y Krochta, 1994; Yildirim y Hettiarachchy, 1998; Liu y col., 2004; Bourtoom, 2009).

La capacidad de los materiales proteicos para transportar y controlar la liberación de compuestos activos amplía la funcionalidad de los materiales. Se han incorporado aditivos para conferir funciones específicas a películas con el fin de mejorar la seguridad, valor nutricional, calidad y/o apariencia de alimentos, tales como antioxidantes, antimicrobianos, vitaminas, microorganismos, probióticos, sabores y colorantes. Como se mencionó anteriormente, se investigaron inicialmente antioxidantes sintéticos (BHA, BHT y galato de propilo) y antimicrobianos (ácidos propiónicos, ascórbicos, benzoicos, sórbicos y sus sales) para la formación de materiales activos para el envasado de alimentos (Han, 2005). Hoy en día, la tendencia actual es la incorporación de aditivos naturales como extractos vegetales ,aceites esenciales (Atarés y col., 2010; Emiroğlu y col., 2010; Salgado y col., 2012 y 2013), compuestos fenólicos e hidrolizados de proteínas (Salgado y col., 2011), que presentan importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Todos estos compuestos además, pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de los materiales resultantes ya que podrían actuar como agentes entrecruzantes o plastificantes (Orliac y

col., 2002; Ou y col., 2005; Salgado y col., 2010 y 2011). La retención y/o liberación de estos aditivos dependerá principalmente de las interacciones que puedan establecer con la matriz proteica y los otros componentes de las películas. Independientemente de las propiedades prometedoras que estas sustancias incorporadas pudieran exhibir *in vitro*, es fundamental su evaluación en sistemas alimenticios reales para confirmar su actividad.

I.7.2.3 Formación de materiales compuestos y nanocompuestos

En la actualidad la formación de materiales compuestos y nanocompuestos es uno de los enfoques ampliamente estudiados para mejorar las propiedades de los materiales proteicos. El objetivo es combinar dos o más materiales a fin de obtener uno nuevo que comparta las ventajas de cada componente y minimice las desventajas que presentan cada uno de ellos por separado.

Las proteínas pueden formar materiales compuestos de dos o más capas (bicapas o multicapas), por redes interpenetradas de dos fases continuas (compuestas por mezclas de proteínas con otros polímeros), o a través del agregado de refuerzos que se dispersen en la matriz proteica (por ejemplo, partículas individuales, fibras, láminas). Dependiendo de las dimensiones de los distintos componentes el material global se denomina compuesto, microcompuesto o nanocompuesto (Vinson y Sierakowski, 2008).

Así, por ejemplo, se ha estudiado la formación de los siguientes materiales compuestos:

- *Materiales obtenidos a partir de mezclas de proteínas con otros polímeros.* Estos materiales han sido formulados con el objetivo de combinar la permeabilidad a gases selectiva de las películas en base a proteínas con las propiedades mecánicas y/o resistencia a la humedad características de otros tipos de polímeros. Se han obtenido películas compuestas con proteínas y otros biopolímeros tales como el quitosano (Rivero y col., 2013), alginato, o carragenanos (Sanchez-García y col., 2010), almidón (Rhim y col., 1999), carboximetilcelulosa (Su y col., 2010), y proteínas de distinto origen (Denavi y col., 2009); con polímeros biodegradables sintéticos como el polivinil alcohol (Su y col., 2007); e incluso con polímeros no biodegradables tales como el polietileno y polipropileno (Lee y col., 2008).
- *Materiales obtenidos a partir de mezclas de proteínas y lípidos.* La incorporación de lípidos en películas proteicas tiene el potencial de mejorar las propiedades de barrera al agua. Los lípidos pueden agregarse en forma de una capa continua sobre la película de proteína, o pueden dispersarse en la matriz hidrofílica. En ambas películas (bicapa y

emulsionadas) la WVP depende principalmente de la polaridad, el grado de saturación del lípido y la naturaleza de las interacciones que se establecen entre los lípidos y la matriz proteica. Entre los diferentes lípidos estudiados, las ceras han sido las más efectivas para mejorar las propiedades barrera de los materiales proteicos (Debeaufort y col., 2000; Quezada-Gallo, 2000). También se han estudiado ácidos grasos y aceites esenciales para la formación de películas compuestas con proteínas (Atarés y col., 2010; Monedero y col., 2009). Las películas bicapa normalmente proporcionan una barrera al vapor de agua más alta que las formadas a partir de emulsiones, pero la delaminación y la necesidad de varias etapas adicionales en la formulación de películas bicapa hacen que las películas emulsionadas sean más adecuadas para aplicaciones alimentarias (Gontard y col., 1995; Debeaufort y col., 2000; Quezada-Gallo y col., 2000).

- *Incorporación de refuerzos en las formulaciones proteicas.* El agregado de un refuerzo en la formulación de materiales proteicos en general busca mejorar la rigidez o estabilidad, la resistencia al impacto mecánico, las propiedades barrera o un cambio en las propiedades eléctricas del material. Estas características dependerán de las características estructurales y fisicoquímicas de los refuerzos, de las propiedades de la matriz proteica, del porcentaje de carga en la formulación, de la naturaleza de la interfase entre la carga y la matriz proteica y de la morfología final del sistema (Vinson y Sierakowski, 2008). Así, se han mejorado las propiedades mecánicas de películas compuestas por proteínas de zeína y/o gluten mediante la incorporación de fibra de vidrio (Beg y col., 2005), de soja con fibras de celulosa largas, cortas o microcristalinas o con lignocelulosa o lignina (Wang y col., 2003). Los materiales a base de proteínas reforzados con fibras naturales ofrecen ventajas como bajo costo, biodegradabilidad y sustentabilidad.

La incorporación de nanorefuerzos (cargas que tienen al menos una dimensión entre 1-100 nm) se ha difundido como una estrategia interesante para mejorar las propiedades de los materiales. Es de esperar que los mismos exhiban mejores propiedades mecánicas y de barrera, estabilidad térmica; resistencia química y apariencia superficial, aun con niveles de carga bajos ($\leq 5-10\%$) debido a la relación de aspecto alta (*high aspect ratio*) y a la gran área superficial de las nanopartículas que le permiten interactuar fuertemente con la matriz polimérica (Rhim y Ng, 2007; Zhao y col., 2008). Las mejoras en las propiedades en general se alcanzan cuando las cargas puedan dispersarse uniformemente dentro de la matriz polimérica, y su distribución depende de la concentración del refuerzo y de la afinidad química de las cargas por la matriz. Se ha encontrado que la adición de una

variedad de nanorefuerzos tales como nanoarcillas, nanopartículas de sílice, nanotubos de carbono, nanofibras de celulosa y nanocristales de almidón, mejoran diversas propiedades físicas y de barrera de las películas resultantes (de Azeredo, 2009). Por ejemplo, la adición de montmorillonita mejoró el comportamiento mecánico y la permeabilidad al vapor de agua y a los gases de películas de proteína de soja y gluten formadas por diferentes técnicas de procesamiento (Echeverría y col., 2014; Tunc y col., 2007). La inclusión de celulosa microcristalina mejoró las propiedades mecánicas de las películas de proteínas de soja (Wang y col., 2013). La incorporación de nanocristales de almidón reforzó la matriz en películas de proteínas de amaranto (Condés, 2012). Estos nanocompuestos se pueden utilizar como vehículos para la liberación de agentes activos y para su liberación controlada (Mascheroni y col., 2010). En este sentido, la presencia de diferentes proporciones de estos refuerzos puede modular las características de transferencia de compuestos activos a través de la película debido a las diferencias producidas en la red proteica por la presencia de estas cargas y como consecuencia de la tortuosidad variable (Tunc y col., 2007; Echeverría y col., 2016). A pesar de los beneficios sustanciales que los nanomateriales pueden conferir a la tecnología de las películas en base a proteínas, la incertidumbre existente sobre la posible toxicidad de las nanopartículas para la salud humana y del medio ambiente, retrasan el uso de los materiales nanocompuestos en muchos campos de aplicación, y especialmente en los relacionados a la industria alimentaria. Resulta necesario avanzar en legislaciones para regular la fabricación, el uso y la eliminación de los nanomateriales hasta que se demuestre que son seguros.

II. Objetivos

II. Objetivos

II.1 Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis fue desarrollar películas activas e inteligentes de matriz proteica para su uso en envases de alimentos.

II.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar películas proteicas capaces de indicar modificaciones en el pH del medio a través del cambio de su coloración

- i. por agregado de indicadores de pH sintéticos a la formulación.
- ii. por agregado de mezclas de indicadores sintéticos para analizar su potencial uso como indicador de deterioro microbiano en carnes.
- iii. por agregado de colorantes naturales:
 - Curcumina.
 - Antocianinas provenientes de repollo colorado.

y analizar en todos los casos el efecto que los aditivos agregados producen sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales, así como su posible activación con propiedades antioxidantes y antimicrobianas cuando corresponda.

2. Desarrollar películas proteicas capaces de indicar cambios de temperatura por aplicación de tintas termocrómicas sobre las películas previamente formadas y analizar el efecto que este proceso produce sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

3. Desarrollar películas antimicrobianas de matriz proteica a través de la incorporación de nanopartículas de plata a la formulación

- i. formadas previamente usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante.

- ii. formadas en la misma dispersión filmogénica.

y evaluar el efecto que la presencia de estas nanopartículas produce en las propiedades fisicoquímicas de los materiales resultantes.

II.3 Soja y gelatina como fuentes de proteínas a utilizar

La totalidad de la Tesis se realizó utilizando dos fuentes proteicas que difieren en su origen, características estructurales y propiedades filmogénicas: gelatina y proteínas de soja. Ambas pueden obtenerse de derivados agroindustriales: la gelatina de la industria cárnica o pesquera y las proteínas de soja del *pellet* residual de la industria aceitera. A continuación se describen las dos fuentes proteicas. Según los requerimientos de cada objetivo se decidió con cual fuente de proteínas se iba a trabajar.

II.3.1 Gelatina

La gelatina es una proteína derivada del colágeno, que no existe como tal en la naturaleza. El colágeno es el componente principal del tejido conectivo de los animales, está constituido por tres cadenas polipeptídicas enrolladas en forma de hélice, estabilizadas por uniones intramoleculares en una estructura superhelicoidal. Existen diferentes formas polimórficas del colágeno siendo el colágeno tipo I uno de los más comunes (Djabourov y col., 1993). La composición aminoácidica del colágeno es muy poco común dado que posee un altísimo contenido de glicina (un tercio del total de residuos aminoacídicos) y es rica en hidroxiprolina y prolina.

Cuando el colágeno es sometido a un proceso de calentamiento en presencia de agua y se alcanza la denominada temperatura de acortamiento, las fibrillas de colágeno reducen su longitud a menos de un tercio de la original. Este acortamiento implica drásticos cambios a nivel estructural: desorganización de las moléculas de proteínas presentes en las fibrillas y colapso de la estructura superhelicoidal. Además de la alteración de las uniones no covalentes, se ven afectadas uniones intra e intermoleculares y la ruptura de unas pocas uniones peptídicas. El resultado de esta conversión de la estructura original del colágeno en una forma más amorfa es conocida como gelatina. Si bien este proceso implica la desnaturalización de la molécula de colágeno, esta no es total. Cuando se disminuye la temperatura ocurre una renaturalización parcial.

La transformación de colágeno en gelatina involucra: a) el pretratamiento de la materia prima y la eliminación de componentes extraños, b) el tratamiento térmico de la materia prima en agua o en solución ácida diluida y c) la refinación y recuperación final de la gelatina. Las propiedades de esta última dependerán del número de uniones presentes en la estructura original del colágeno que hayan sido alteradas durante el tratamiento. (Mauri y Añón, 2012)

II.3.2 Proteínas de soja

Las proteínas constituyen un 40% p/p de las semillas de soja. Están comercialmente disponibles en tres formas diferentes: harina de soja (50-65% de proteína en base seca), concentrados de proteína de soja (65-90% de proteína en base seca) y aislados de proteína de soja (SPI > 90% proteína en base seca) (FAO, Song y col., 2011). El contenido proteico de SPI los convierte en la fuente más adecuada para preparar películas y recubrimientos. Se han identificado dos fracciones proteicas principales en las semillas de soja: las albúminas -solubles en agua- y globulinas -solubles en soluciones salinas-. La fracción de las globulinas, que representa el 80% de la proteína total, se caracteriza por contener proteínas solubles a pH > 8 que precipitan a pH 4,5 (pI), presentando bajo contenido de metionina y cisteína, ubicadas en los cuerpos proteicos e hidrolizadas durante la germinación (Utsumi y col., 1997). Se han identificado cuatro fracciones con diferentes coeficientes de sedimentación por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa: i) la fracción 2S (20% de proteínas totales) que es soluble a pH 4,5 y contiene inhibidores de proteasa -Bowman-Birk (7,8 kDa) y Kunitz (21,5 kDa)-, citocromo C, α -conglucina y proteasas; ii) la fracción 7S (35% de la proteína total) compuesta de lectina (o hemaglutinina), lipoxigenasa, amilasa y β y γ -conglucinas; iii) la fracción 11S (35% de la proteína total) compuesta de glicina, y iv) la fracción 15S (10% de la proteína total) que contiene polímeros de la 11S (Utsumi y col., 1997; Wolf, 1970; Hill, 1974; Fukushima, 1991; Petruccelli y Añón, 1995). Los aislados de proteína de soja contienen principalmente globulinas 7S y 11S (Petruccelli y Añón, 1995; Nishinari y col., 2014). La β -conglucina (7S) es una glicoproteína compleja que exhibe polimorfismo en la composición de sus subunidades. Es un trímero con una masa molecular de 180-200 kDa, formado por tres polipéptidos diferentes designados como α , α' y β (68, 72 y 52 kDa, respectivamente) unidos por enlaces no covalentes (Badley y col., 1975; Peng y col., 1984; Maruyama y col., 2001; Adachi y col., 2003). Por otra parte, la glicina (11S) tiene una estructura

cuaternaria compleja organizada en hexámeros ((AB)₆ de aproximadamente 320-380 kDa) compuesta por dos trímeros unidos por interacciones hidrofóbicas. Todas estas subunidades (de aproximadamente 50-70 kDa) se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes y están formadas por un polipéptido ácido (polipéptido A, de aproximadamente 30 kDa) y un polipéptido básico (polipéptido B, de aproximadamente 20 kDa) unidos por un enlace disulfuro (Maruyama y col., 2001; Adachi y col., 2003, Mauri y Añón, 2012).

Las descripciones anteriores muestran claramente la diversidad y complejidad de las diferentes estructuras que pueden presentar las proteínas. Se sabe que la conformación nativa de las proteínas deriva de su estructura secundaria y terciaria y de las interacciones que establecen con el medio. Esta conformación es por lo tanto frágil y puede verse modificada por variables tales como temperatura, pH, fuerza iónica y constante dieléctrica del medio, alta presión, tratamientos mecánicos, irradiación, etc. La modificación de la conformación proteica puede tener un impacto positivo o negativo en sus propiedades funcionales (Utsumi y col., 1997; Zayas, 1997; Foegeding y Davis, 2011; Moure y col., 2006; Sorgentini y col., 1995; Wagner y col., 1996). El proceso utilizado para la obtención de gelatina o la preparación de aislados proteicos de soja podría conducir a proteínas con diferentes conformaciones, capaces de formar películas con funcionalidades diferentes (Song y col., 2011; Gennadios, 2002; Mauri y Añón, 2012; Mauri y Añón, 2006 y 2008)

Ambas fuentes proteicas han sido extensamente estudiadas por su capacidad de formar materiales comestibles y/o biodegradables (Etxabide y col., 2017; Song, 2011). Muchos de los trabajos científicos realizados en esta temática con estas proteínas se mencionan y discuten en el trascurso de la Tesis.

La elección de estas proteínas para el desarrollo de cada objetivo se basó en las características propias de cada una. Así por ejemplo, en el caso que se requerían materiales incoloros se trabajó con gelatina, y en aquellos donde se exigía mayor resistencia se trabajó con proteínas de soja.

III. Películas proteicas
capaces de indicar
modificaciones en el pH del
medio, a través del cambio
de su coloración

Los alimentos pueden experimentar diferentes procesos de deterioro durante su almacenamiento. Estos procesos pueden clasificarse según sus causas, en alteraciones físicas, químicas o biológicas. Las alteraciones físicas se refieren a ganancias o pérdidas de humedad, exposición a temperaturas inapropiadas y a radiaciones. Dentro de las alteraciones químicas se pueden mencionar reacciones de hidrólisis, caramelización, pardeamiento no enzimático, y autooxidación lipídica. Las alteraciones biológicas son las producidas por enzimas endógenas, proliferación y metabolismo de microorganismos, e infestación por insectos, parásitos y roedores. Como consecuencia de estos procesos se modifican distintas características en los alimentos, las más afectadas son: textura, sabor, aroma, color y valor nutritivo (Fennema, 2010).

La proliferación y el metabolismo de los microorganismos pueden causar alteraciones en las macromoléculas que componen los alimentos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), modificar su pH, actividad acuosa y potencial redox, e inclusive modificar la disponibilidad de sus nutrientes (Gadea y col., 2016). Además, el desarrollo de microorganismos patógenos en los productos alimenticios pone en riesgo la salud del consumidor, siendo la inocuidad (o seguridad microbiológica) un requisito fundamental para su comercialización y consumo (CAA).

En particular, el pH es una variable que influencia las velocidades de muchas reacciones químicas y enzimáticas. Los cambios de pH, aún aquellos relativamente pequeños, pueden ocasionar profundas modificaciones en la calidad de algunos alimentos, como por ejemplo en los músculos (Fennema, 2010). Varios autores describieron cambios de pH en alimentos envasados y/o en su entorno debido a modificaciones en las concentraciones de ácidos orgánicos (tales como n-butilato, ácido L-láctico, D-lactato y ácido acético) o al desarrollo de compuestos volátiles (como trimetilamina, dimetilamina, hipoxantina, putrescina, tiramina, cadaverina y sulfuro de hidrógeno, entre otros) como resultado del desarrollo microbiano (Al Bulushi y col., 2009; Ruiz-Capillas y Jimenez-Colmenero, 2004).

Por estas razones, el cambio en el pH del medio circundante al alimento, puede ser indicativo del deterioro del producto. Los materiales de envase capaces de notificar ese cambio entran en la categoría de inteligentes y podrían indicar al productor, distribuidor o al consumidor sobre la calidad del alimento envasado. Existen algunos trabajos en bibliografía que consiguen esta finalidad a través del agregado de indicadores de pH a las formulaciones. Algunos ejemplos fueron mencionados en la sección 1.4.1. La mayoría de ellos usan polímeros sintéticos y algunos biopolímeros, principalmente polisacáridos.

En este contexto, el **objetivo** de esta primera parte de la Tesis fue desarrollar películas proteicas capaces de indicar modificaciones en el pH del medio, a través de cambios de su coloración.

Para ello, inicialmente se analizó la capacidad de respuesta de películas aditivadas con indicadores ácido-base sintéticos puros y sus mezclas frente a cambios de pH del medio intentando simular su contacto con distintos tipos de alimentos. Posteriormente, se evaluó su posible aplicación en sistemas reales. Por último, se avanzó en el desarrollo de materiales que tuvieran la capacidad de indicar el cambio de pH, pero que fueran amigables con el medio ambiente y aptos para estar en contacto con alimentos, a través de la utilización de indicadores ácido-base naturales como curcumina y antocianinas extraídas de repollo colorado.

III.1. Películas proteicas aditivadas con indicadores ácido-base sintéticos

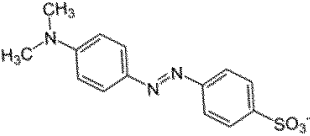
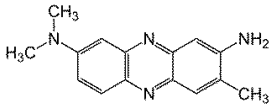
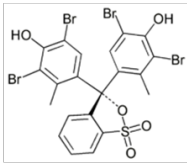
III.1.1 Introducción

Los indicadores ácido-base son sustancias que reaccionan a cambios del pH del medio. Estas sustancias sufren modificaciones en sus estructuras químicas inducidas por protonación o desprotonación de las especies participantes en los equilibrios ácido-base. Generalmente son ácidos o bases débiles que, cuando se disuelven en el agua, se disocian ligeramente y forman iones (Sabnis, 2007). En algunos casos, estas modificaciones estructurales pueden evidenciarse como cambios de coloración si las sustancias indicadoras de pH presentan dos colores diferentes en sus formas ácido-base conjugadas. Numerosos indicadores ácido-base sintéticos como verde de bromocresol, rojo neutro, rojo fenol, púrpura de bromocresol, rojo de cresol, fenolftaleína, azul de bromotimol, azul de xilenol, P-naftolbenceína y sus combinaciones, han sido adicionados a distintas matrices poliméricas tales como alcohol polivinílico, acetato de celulosa o polietileno, con el fin de desarrollar materiales capaces de detectar CO₂, SO₂ y aminas volátiles, entre otros compuestos (Booher y Gorski, 2011; Eagland, 2004; Booher y Gorski, 2011; Pacquit y col. , 2006 y 2007). La utilidad de estos sistemas está estrechamente ligada al producto que se desea proteger. En el caso de los materiales utilizados para el envasado de alimentos, éstos deben estar compuestos por sustancias incluidas en las listas positivas de la FDA (Food and Drug Administration), de CE (Unión Europea o Estados Miembro de la Unión Europea) o del Mercosur (MERCOSUR/GMC/RES Nro. 56/92; Capítulo IV del CAA). Para estas aplicaciones, los indicadores ácido-base sintéticos antes mencionados se han utilizado como sistemas “modelo” ya que se trata de compuestos puros cuya respuesta a cambios de pH es notoria. Sin embargo, dichos indicadores ácido-base no presentan el estado GRAS (generalmente reconocidos como seguros), por lo que no deberían estar en contacto con alimentos (Apartado de colorantes permitidos, FDA).

En este trabajo se utilizaron tres indicadores ácido-base sintéticos con diferente estructura química y variaciones de color significativas en una amplia gama de pH para activar películas de proteínas: naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) y verde de bromocresol (VBC). En la Tabla III.1.1 se presentan sus estructuras químicas, sus constantes de

disociación (pKa), sus coloraciones en relación al pH y las longitudes de onda en el visible en donde tienen su máximo de absorción.

Tabla III.1.1 Estructura química, constante de disociación (pKa), color en función del pH y longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) en el visible de los indicadores utilizados: naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) y verde de bromocresol (VBC).

| Indicador ácido base | Estructura Química | λ_{max} | pKa | Cambio de coloración |
|-----------------------------------|--|-----------------|-----|-------------------------|
| Naranja de metilo (NM) |  | 507-522 nm | 3.7 | Rojo a pH<3.0 |
| | | 464 nm | | Amarillo a pH>4.4 |
| Rojo neutro (RN) |  | 529-544 nm | 7.4 | Rojo a pH<6.8 |
| | | 454 nm | | Amarillo a pH>8.0 |
| Verde de Bromocresol (VBC) |  | 423-444 nm | 4.6 | Amarillo a pH<3.8 |
| | | 617 nm | | Azul a pH>5.4 |

Datos según Sabnis (2007).

El naranja de metilo es un colorante azoderivado, también llamado heliantina. Presenta un cambio de color de rojo a naranja-amarillo entre pH 3 y 4,4. El nombre del compuesto químico del indicador es sal sódica de ácido sulfónico de 4-dimetilaminoazobenceno. En la actualidad se registran muchas aplicaciones de este compuesto, desde preparaciones farmacéuticas (para detección de microorganismos; tinción de leucocitos, ácidos nucleicos y uñas; tratamiento de enfermedades dermatológicas, etc.) hasta su uso en determinaciones de la alcalinidad en productos petroleros (Sabnis, 2010).

El rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina clorhidrato) actúa entre pH 6,8 y 8 variando su color de rojo a amarillo. Se suele utilizar para la determinación de ácidos durante la fermentación de carbohidratos; también se emplea en pantallas de cristal líquido, células solares, sensores, etc.

El verde de bromocresol (3,3', 5,5'-tetrabromo-m- cresolsulfonftaleína) actúa entre los pH 3,8 y 5,4 cambiando su coloración de amarillo a azul. Se puede implementar en su forma de ácido libre (sólido marrón claro), o como una sal de sodio (sólido de color verde oscuro). Es utilizado en la formulación de telas, envases, detergentes y cosméticos entre otras aplicaciones (Sabnis, 2007).

A pesar que muchas proteínas vegetales y animales se han utilizado recientemente como materias primas para la producción de envases activos (Campos y col., 2011; Mellinas y col., 2015; Salgado y col., 2015; Silva- Weiss y col., 2013) no hay literatura relacionada con el desarrollo de películas proteicas capaces de indicar cambios de pH en forma colorimétrica. Probablemente esto se deba a la elevada complejidad estructural y las propiedades anfotéricas que presentan estas macromoléculas. Se ha demostrado que la estructura de la proteína (conformación primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) determina la capacidad de los polipéptidos de interactuar entre sí y con los otros componentes presentes en la formulación (Mauri y Añón, 2008; Salgado y col., 2016). Además, las proteínas al ser moléculas anfóteras pueden actuar como *buffers*. Por lo tanto, es posible que estas macromoléculas interfieran en la respuesta de los indicadores de pH.

El **objetivo** de este capítulo fue desarrollar películas de gelatina aditivadas con naranja de metilo, rojo neutro y verde de bromocresol; evaluar su capacidad de respuesta frente a medios líquidos, semisólidos y gaseosos (utilizados como simulantes de alimentos o del espacio de cabeza del envase); y analizar el efecto que los aditivos agregados causan sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

En este caso, se utilizó gelatina como fuente proteica ya que forma películas incoloras (Gómez-Guillén y col., 2009) a diferencia de las basadas en proteínas vegetales que generalmente presentan cierta coloración propia de los compuestos que se co-extraen con ellas (Salgado y col., 2010). Es de esperar que la ausencia de color de las películas de gelatina permita visualizar claramente el cambio de la coloración del indicador al modificarse el pH del medio, evitando interferencias.

III.1.2 Materiales y métodos

III.1.2.1 Materiales.

Se utilizó gelatina bovina (Royal, Kraft Foods, Argentina) con un valor de Bloom de 240 (determinado según Rivero, 2009) como fuente proteica. Su contenido de proteínas, determinado por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995) fue de $87,8 \pm 0,6$ % p/p (expresado en base seca; N x 5,5) (USDA). Se empleó glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante y tres indicadores ácido-base: naranja de metilo (**NM**, Mallinckrodt Baker, EE.UU), rojo neutro (**RN**, Pablo Zubizarreta Ward, Argentina) y verde de bromocresol (**VBC**, sal monosódica, Anedra, Argentina) (Tabla III.1.1).

III.1.2.2 Formación de las películas

Las películas se formaron por la técnica de *casting*. Se prepararon dos dispersiones acuosas: una conteniendo 5 g de gelatina en 50 ml de agua destilada a 100°C y otra conteniendo 1,25 g de glicerol (25% p/p respecto de la cantidad de gelatina) y 20 mg de naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) o verde de bromocresol (VBC) en 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Ambas dispersiones se mezclaron con agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente y se ajustó su pH a 2, 6 y 11, con soluciones de HCl o NaOH 2M. Finalmente, 10 ml de cada dispersión filmogénica se colocaron sobre placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en una estufa con circulación forzada de aire (Yamato, DKN600, EE.UU.) a 60°C durante 3 h. Las películas resultantes se acondicionaron 48 h a 20°C y 58% de humedad relativa (en desecadores con soluciones saturadas de NaBr) previo a ser removidas de las placas para su caracterización. Como controles se obtuvieron películas de gelatina sin la incorporación de los indicadores ácido-base en las dispersiones de filmogénicas a pH = 2, 6 y 11. Las películas de gelatina control se nombraron G y las aditivadas con NM, RN y VBC se denominaron G+NM, G+RN y G+VBC respectivamente.

III.1.2.3 Caracterización de las películas

III.1.2.3.1 Espesor

El espesor de las películas se determinó con un calibre digital (Check Line DCN-900, EE.UU.) para materiales no conductores ni ferrosos. Las mediciones se realizaron en cinco posiciones a lo largo de las probetas rectangulares utilizadas para el ensayo de tracción, y en el centro y en ocho posiciones alrededor del perímetro de las muestras usadas para las

determinaciones de permeabilidad al vapor de agua. Los valores informados corresponden al promedio de las determinaciones.

III.1.2.3.2 Contenido de agua (MC)

Luego del acondicionamiento de las películas, se cortaron pequeñas muestras y se pesaron antes y después del secado en estufa a 105°C durante 24 h (ASTM D644-99, 2004). Los valores de contenido de humedad (MC) se calcularon como el porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso original. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada película.

III.1.2.3.3 Color

El color de las películas se determinó con un colorímetro Kónica Minolta Chroma Meter CR-400 (Kónica Minolta Chroma Co., Osaka, Japón). Se utilizó la escala de color CIE-Lab para medir luminosidad (L^* : 0 = negro, 100 = blanco) y cromaticidad (a^* : +a = rojo, -a = verde; b^* : +b = amarillo, -b = azul), que se esquematiza en la Figura III.1.1. El colorímetro fue calibrado usando una placa estándar blanca con coordenadas de color de $L^*_{estándar} = 97,55$, $a^*_{estándar} = 0,14$ y $b^*_{estándar} = 1,73$ proporcionado por Minolta. El color de las películas se midió colocándolas sobre la superficie de esta placa estándar y la diferencia de color total (ΔE^*) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = [(L^*_{película} - L^*_{estándar})^2 + (a^*_{película} - a^*_{estándar})^2 + (b^*_{película} - b^*_{estándar})^2]^{0.5}$$

Ecuación III.1.1

Donde: ΔE : diferencia total de color entre la muestra y la placa estándar. Parámetros CIE-Lab L^* : luminosidad, a^* y b^* : cromaticidad, de la muestra y de la placa estándar.

Los valores se expresaron como el promedio de nueve determinaciones en diferentes áreas de cada película.

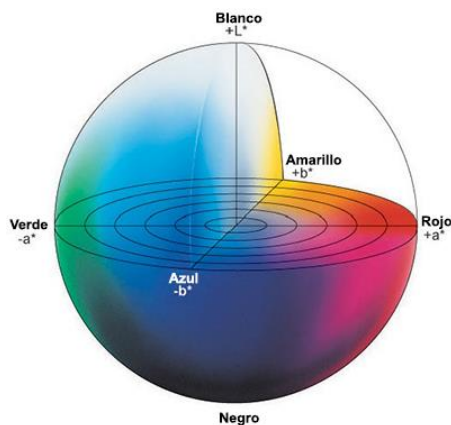


Figura III.1.1 Representación gráfica del espacio de color según la escala CIE L*a*b*.

III.1.2.3.4 Espectro de absorción de luz visible

Cada muestra de película se cortó en una pieza rectangular y se colocó directamente en una celda de espectrofotómetro. Se obtuvo un espectro de absorción de luz visible de cada película en función de la longitud de onda (Beckman DU650, Alemania). Las mediciones se realizaron utilizando una celda vacía como referencia. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

III.1.2.3.5 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Las determinaciones de permeabilidad al vapor de agua se llevaron a cabo de acuerdo según el método ASTM E96-00 (ASTM, 2004) con algunas modificaciones. Las películas se colocaron sobre un área circular de $0,00185 \text{ m}^2$ en una celda de permeación que se almacenó a 20°C en desecadores (Figura III.1.2). La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de $1753,35 \text{ Pa}$. Para mantener dicha fuerza impulsora se colocó sílice anhidra ($0\% \text{ HR}_c$) dentro de la celda y una solución saturada de NaCl ($75\% \text{ HR}_b$) en el desecador. La humedad relativa dentro de la celda fue siempre menor que la del desecador, por lo que la permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 h), se realizaron 8 determinaciones de peso de la celda de permeación durante 8 h. Los cambios en el peso de la celda en función del tiempo fueron registrados y graficados. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal. La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la Ecuación III.1.2.

$$WVP = [(\Delta m / \Delta t / (P_{v_{H_2O}} \times (RH_D - RH_C) \cdot A))] \times d \quad \text{Ecuación III.1.2}$$

Donde: WVP = permeabilidad al vapor de agua ($\text{g}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \text{Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$); $\Delta m / \Delta t$: velocidad de permeación del vapor de agua ($\text{g H}_2\text{O s}^{-1}$); $P_{v_{\text{H}_2\text{O}}}$ = presión de saturación del vapor de agua a la temperatura de ensayo (2339,27 Pa a 20°C); $RH_D - RH_C$ = gradiente de humedad relativa a través de la película (0,75); A = área de permeación (m^2); y d = espesor de la película (m). Cada valor de WVP corresponde al valor medio de dos muestras tomadas de diferentes películas obtenidas de la misma dispersión filmogénica.

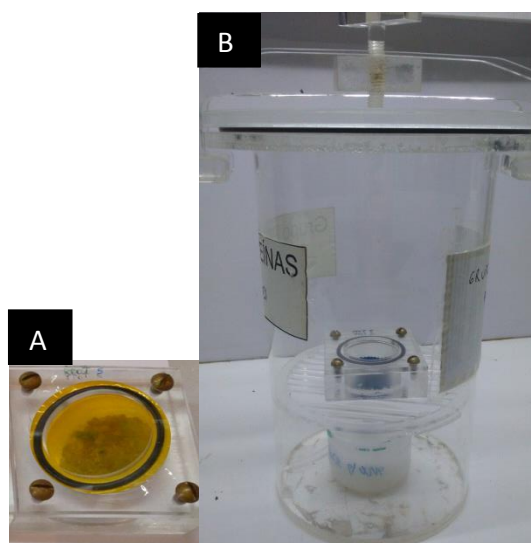


Figura III.1.2. Equipamiento empleado para medir permeabilidad al vapor de agua. **A.** celda de permeabilidad con sílica en su interior (0% RH_C). **B.** Celda de permeabilidad ubicada en el interior de la cámara de permeabilidad que contiene solución saturada de NaCl (75% RH_D).

III.1.2.3.6 Solubilidad en agua (S)

La solubilidad en agua de las películas se determinó según describió Gontard y col. (1994) con algunas modificaciones. Tres círculos de las películas se pesaron (diámetro = 2 cm; ~ 0,03 a 0,05 g) y se sumergieron en 50 ml de agua destilada. Se agitaron a 100 rpm durante 24 horas a 20°C (Ferca, modelo TT400, Argentina). Los restos de las películas que no se disolvieron en agua se separaron filtrando sobre papel Whatman n° 1 (previamente secado y pesado) y se secaron a 105°C durante 24 h. La solubilidad de la película en agua (S, en %) se calculó según la ecuación III.1.3.

$$S = [(P_0 (100 - MC)) - P_f] \cdot 100 / [P_0 \cdot (100 - MC)] \quad \text{Ecuación III.1.3}$$

Donde P_0 = peso inicial de la película (g); P_f = peso final de la película seca (g); MC = contenido de agua (%).

Las determinaciones de solubilidad en agua se realizaron por triplicado.

III.1.2.3.7 Temperatura de transición vítrea (T_g)

La temperatura de transición vítrea de las películas se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro TA 2010 Q100 v9.8 Build 296 (TA Instrument, New Castle, Delaware, EE.UU.). La calibración de la temperatura y el flujo de calor del equipo se llevaron a cabo de acuerdo con métodos de ASTM, utilizando indio y los ácidos láurico y esteárico como estándares. Se prepararon cápsulas de aluminio con aproximadamente 5 mg de película, se sellaron herméticamente y se escanearon a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en el rango de -80 a 150°C . La temperatura de transición vítrea (T_g , en $^\circ\text{C}$) se definió como el punto de inflexión de la línea de base causada por la discontinuidad del calor específico de la muestra (ASTM D3418-03, 2004), y se calculó utilizando el software de análisis universal V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., EE.UU.). Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

III.1.2.3.8 Propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas en ensayos de tracción, de acuerdo a la norma ASTM (2004), empleando un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG y acoplado a un *software* específico (Texture Expert V.1.22, Stable Micro Systems, Inglaterra) (Figura III.1.3 A). Se utilizaron probetas de películas de 70 mm de longitud y de 6 mm de ancho. La separación inicial de las mordazas se fijó en 50 mm y la velocidad de separación de las mismas a $0,4 \text{ mm/s}$. Las mediciones se realizaron a una temperatura controlada de 20°C . Las curvas de fuerza (N) en función de la distancia (mm) fueron registradas por el *software*. Las propiedades mecánicas se calcularon a partir de la curva de tensión (σ =fuerza/área transversal de la película) vs. deformación (ϵ =porcentaje de elongación respecto de la separación inicial de mordazas). En la Figura III.1.3 B se muestra una curva a modo de ejemplo. De las mismas se obtiene la resistencia a la tracción al momento de ruptura (σ_r), la elongación a la rotura (ϵ_r) y el módulo de Young (E) como la pendiente de la recta

tangente a la curva tensión-deformación en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones). Los valores informados son el promedio de al menos doce repeticiones tomadas de diferentes películas para cada formulación.

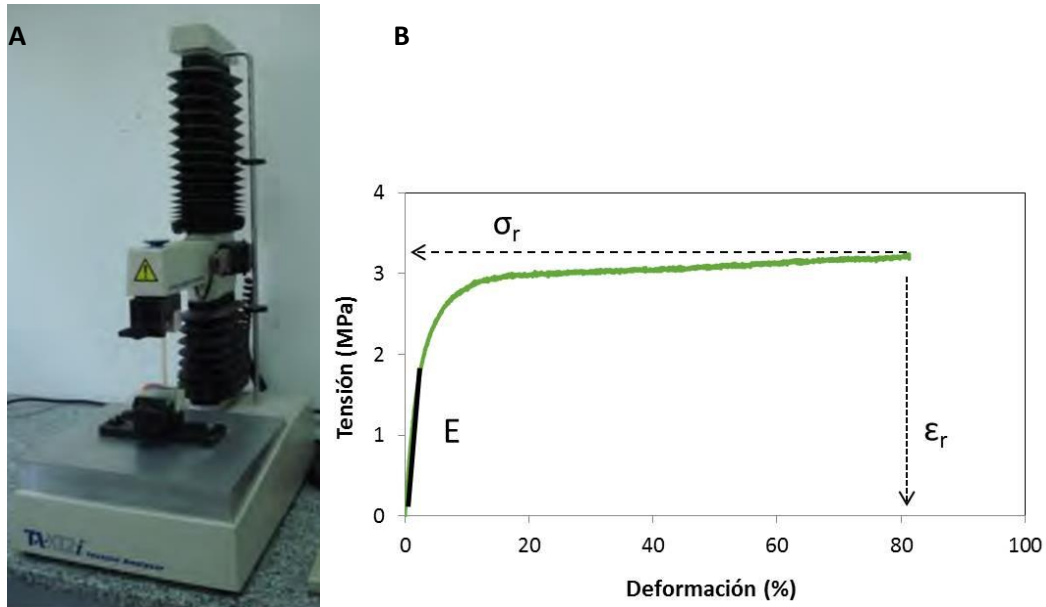


Figura III.1.3. A. Dispositivo empleado en el ensayo de tracción. **B.** Curva tensión vs. deformación para una película proteica, en donde se pueden observar los parámetros evaluados: tensión a la ruptura (σ_r), elongación a la rotura (ϵ_r), y módulo de Young (E).

III.1.2.4 Respuesta de las películas a los cambios de pH

Cada película se enfrentó a medios líquidos, semisólidos y gaseosos, ácidos y alcalinos: i) colocando una gota de HCl 2 M o NaOH 2 M directamente sobre las películas; ii) colocando las películas en contacto con geles de gelatina a pH = 2,5, y 11 (preparados a partir de dispersiones al 7,5% p/v); y iii) exponiendo las películas a atmósferas gaseosas generadas por ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, pKa \sim 4,8, Anedra, Argentina) y amoníaco (NH_3 , pKa \sim 9,3, Anedra, Argentina). La respuesta de las películas frente a los cambios de pH fue registrada fotografiando con una cámara digital (Kodak M853, EE.UU.) a las películas antes y después de haberlas puesto en contacto con los medios ensayados, y midiendo los parámetros de color en los mismos momentos, según se describió en la sección III.1.2.3.3.

III.1.2.5 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Se utilizaron dos factores -pH y la presencia de indicador ácido-base-, en tres y cuatro niveles respectivamente (pH: 2, 6 y 11; películas: G, G+NM, G+RN y G+VBC). Las medias fueron evaluadas por el test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$ utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statgraphics, EE.UU.).

III.1.3 Resultados y discusión

III.1.3.1 Apariencia y propiedades ópticas de películas

Todas las películas de gelatina preparadas con o sin el agregado de los indicadores ácido-base a pH: 2, 6 y 11 resultaron homogéneas, delgadas, flexibles y transparentes. La Figura III.1.4 muestra su apariencia visual.

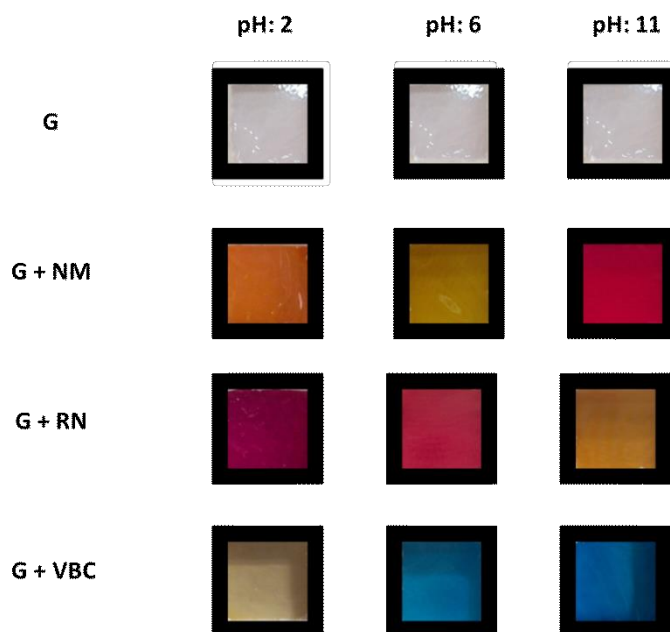


Figura III.1.4. Apariencia visual de las películas de gelatina control (G) y con agregado de naranja de metilo (G+NM), rojo neutro (G+RN) y verde de bromocresol (G+VBC) a pH: 2, 6 y 11.

Las películas de gelatina control (G) resultaron incoloras para todos los pH ensayados. La adición de naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) y verde de bromocresol (VBC) a las

formulaciones permitió obtener películas con colores bien definidos dependientes del pH de las dispersiones filmogénicas (2, 6, y 11) y concordantes con la coloración propia del colorante a cada pH (Tabla III.1.1)

Tabla III.1.2. Parámetros de color CIE-Lab de las películas de gelatina control (G) y con agregado de naranja de metilo (G+NM), rojo neutro (G+RN) y verde de bromocresol (G+VBC) a pH: 2, 6 y 11.

| Películas | pH | L* | a* | b* | ΔE^* |
|--------------|----|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| G | 2 | 94,41 ± 0,21 ^{a/x} | -0,79 ± 0,06 ^{a/x} | 2,10 ± 0,17 ^{a/x} | 2,06 ± 0,12 ^{a/x} |
| | 6 | 93,35 ± 0,55 ^{a/x} | -0,94 ± 0,07 ^{a/x} | 2,70 ± 0,61 ^{a/x} | 1,85 ± 0,52 ^{a/x} |
| | 11 | 93,87 ± 0,58 ^{a/x} | -1,07 ± 0,07 ^{a/x} | 2,05 ± 0,11 ^{a/x} | 2,64 ± 0,22 ^{b/x} |
| G+NM | 2 | 80,30 ± 0,50 ^{a/y} | 26,50 ± 0,04 ^{a/y} | 61,70 ± 1,62 ^{a/y} | 11,8 ± 0,09 ^{a/y} |
| | 6 | 79,67 ± 0,28 ^{a/y} | 17,11 ± 0,26 ^{b/y} | 65,27 ± 0,08 ^{b/y} | 11,30 ± 0,05 ^{b/y} |
| | 11 | 47,02 ± 0,29 ^{b/y} | 58,34 ± 0,37 ^{c/y} | -4,17 ± 0,18 ^{c/y} | 2,41 ± 0,29 ^{c/x} |
| G+RN | 2 | 50,63 ± 0,72 ^{a/z} | 58,01 ± 0,52 ^{a/z} | 4,64 ± 0,37 ^{a/x} | 5,48 ± 0,17 ^{a/z} |
| | 6 | 62,69 ± 0,64 ^{b/z} | 23,12 ± 0,92 ^{b/z} | 25,85 ± 0,49 ^{b/z} | 5,18 ± 0,17 ^{b/z} |
| | 11 | 64,93 ± 0,98 ^{c/z} | 16,81 ± 0,85 ^{c/z} | 20,32 ± 0,74 ^{c/z} | 3,25 ± 0,10 ^{c/y} |
| G+VBC | 2 | 91,53 ± 0,46 ^{a/w} | -5,73 ± 0,02 ^{a/w} | 31,57 ± 0,84 ^{a/z} | 6,18 ± 0,13 ^{a/w} |
| | 6 | 57,41 ± 0,23 ^{b/w} | -10,66 ± 1,13 ^{b/w} | -32,33 ± 1,89 ^{b/w} | 12,94 ± 0,50 ^{b/z} |
| | 11 | 43,33 ± 1,24 ^{c/w} | -5,21 ± 0,42 ^{c/w} | -47,01 ± 0,48 ^{c/w} | 14,63 ± 0,09 ^{c/z} |

Los valores informados de cada película de gelatina son el promedio ± la desviación estándar. Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) entre los diferentes pH de la dispersión filmogénica para la misma formulación, según el ensayo de Tukey. Diferentes letras (w, x, y, z) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) entre los diferentes indicadores ácido-base para el mismo pH de la dispersión filmogénica, según el test de Tukey

Los parámetros de color y los espectros de absorción de luz visible de las películas estudiadas se muestran en la Tabla III.1.2 y la Figura III.1.5 respectivamente. Independientemente del pH de las dispersiones filmogénicas, las películas de gelatina control (G) mostraron una alta luminosidad (L*), ausencia de color (valores bajos de a*, b*

y ΔE^*) ($p > 0,05$) y presentaron valores de absorbancia muy bajos en sus espectros de absorción de luz visible (datos no mostrados). Sin embargo, estas películas proteicas adquirieron una coloración específica con la adición de los indicadores ácido-base a las formulaciones, que se caracterizó por diferentes valores de a^* y b^* , y valores de L^* significativamente menores que las películas control G ($p < 0,05$) (Tabla III.1.2.).

Los espectros de absorción de las películas coloreadas mostraron picos a diferentes longitudes de onda en el rango visible, que se relacionan con sus respectivos colores. Las películas G+NM resultaron de color naranja a pH 2, de color amarillo a pH 6, y púrpura a pH 11, con máximos de absorción ($\lambda_{m\acute{a}x}$) a 510 nm, 430 nm y 570 nm en sus respectivos espectros (Figura III.1.5.A). Cabe destacar que el cambio de coloración verificado en las películas con NM a pH alcalino no se informa en la literatura citada (Sabnis, 2007). Por su parte, las películas G+RN resultaron de color amarillo a pH 11, y púrpura en $pH \leq 6$, con $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 460 nm y 520 nm en sus respectivos espectros visible (Figura III.1.5.B). Cabe destacar que las películas G+RN preparadas a pH 2 mostraron mayores valores de absorbancia y una mayor intensidad en el color observado (con valores más altos de a^* y los valores más bajos de b^*) que las preparadas a pH 6. Las películas G+VBC resultaron con un color amarillo tenue a pH 2 y un color azul a pH 6 y 11, con máximos de absorción en 440 nm y 620 nm respectivamente (Figura III.1.5.C). Para este indicador, las películas a pH 11 mostraron una coloración más intensa que las de pH 6, esto se evidencia por un aumento de su pico de absorción de luz visible, un valor más negativo del parámetro b^* y un mayor valor de ΔE^* . La coloración de las películas podría ser considerada como un atributo adicional para algunas aplicaciones comerciales. Algunos de estos materiales pueden actuar como barreras a la luz visible pudiendo servir como protección de productos alimenticios susceptibles de oxidación (Cian y col., 2014).

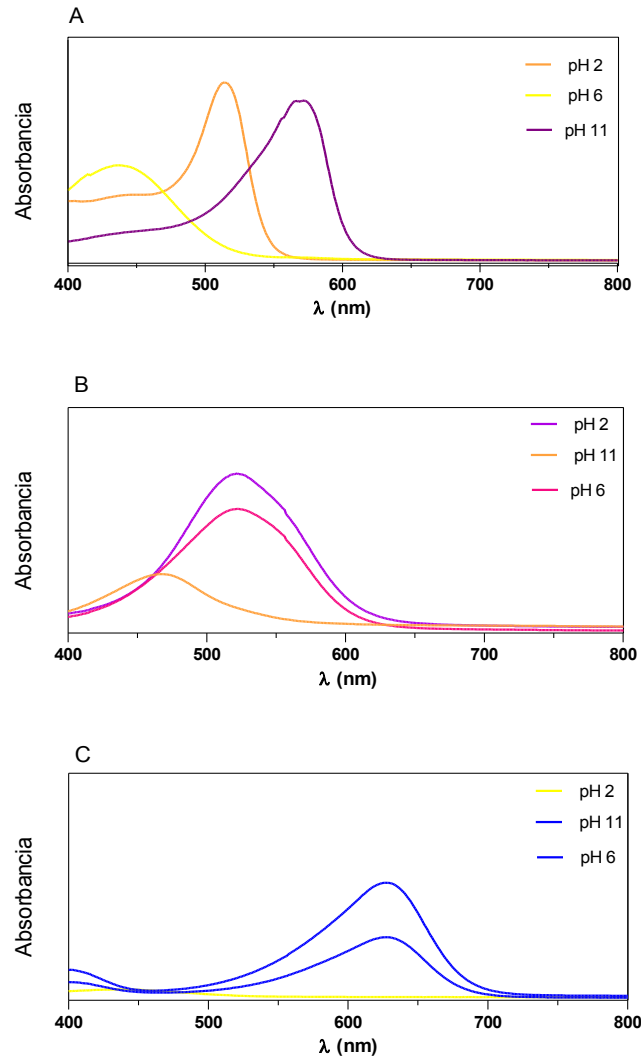


Figura III.1.5. Espectros de absorción de luz visible (400-800 nm) de películas de gelatina con agregado de naranja de metilo (A), rojo neutro (B) y verde de bromocresol (C) a pH 2, 6, y 11.

III.1.3.2 Respuesta de las películas aditivadas con colorantes sintéticos a los cambios de pH

La Figura III.1.6 muestra la respuesta de todas las películas desarrolladas cuando se las colocó en contacto con medios ácidos y alcalinos, líquidos, semisólidos y gaseosos. Este ensayo permitió verificar la capacidad de estas películas para detectar cambios de pH, simulando que estos cambios pueden ocurrir en un alimento líquido o semisólido, o en el espacio de cabeza de un envase de alimentos como el resultado de productos provenientes de reacciones de deterioro de los alimentos. Por lo tanto, los materiales podrían informar indirectamente la calidad del producto durante su almacenamiento y su distribución hasta ser consumido.

Todos los cambios de color que se observan en la Figura III.1.6, resultaron reversibles y fueron confirmados por medidas colorimétricas. Los parámetros de color L^* , a^* , b^* se muestran en la Tabla III.1.3 A, B y C para (G+NM), (G+RN) y (G+VBC) respectivamente.

Las películas de gelatina incorporadas con NM, RN, y VBC modificaron su color después de estar en contacto con soluciones ácidas o alcalinas de HCl o NaOH respectivamente, atmósferas gaseosas de ácido acético o amoníaco, y geles de gelatina a pH 2,5 y 11; a excepción de aquellos en los que el pH del medio y la película fueron similares. En las respuestas frente a los medios líquidos y gaseosos de diferente pH, los cambios de coloración fueron notables e inmediatos, pero menos evidentes y más lentos en los medios semisólidos. La cinética de viraje de los indicadores ácido-base frente a los medios semisólidos resultó más lenta, lo que probablemente pueda atribuirse a limitaciones en los procesos difusivos.

La Figura III.1.6. muestra los cambios de color de las películas G+NM después de estar en contacto con los diferentes medios a distintos pH. Las películas obtenidas a pH 6 resultaron inicialmente amarillas, pero cambiaron su coloración a naranja o púrpura con una gota de soluciones de HCl o NaOH, respectivamente. Se observó el mismo comportamiento cuando las películas se expusieron a atmósferas gaseosas ácidas o alcalinas. Cabe destacar que la atmósfera gaseosa ácida producida por el ácido acético no alteró el color de la película de color amarillo a pH 6, sin alcanzar el color naranja característico de NM en medio ácido y tomó color púrpura a pH 11. Esto podría atribuirse al pK_a del ácido acético ($pK_a \sim 4,8$) que es mayor que el pH en el que NM se convierte en su forma ácida ($pK_a = 3,7$). Las películas a pH 6 y 11 en contacto con el medio semisólido a pH 2,5 viraron a la coloración amarilla obtenida por las películas a pH ácido, en lugar de la coloración naranja esperada. Esto podría atribuirse a la difusión del indicador hacia el gel durante el ensayo. Mientras frente a los medios semisólidos a pH 11, las películas a pH 6 llegaron a la coloración púrpura, pero las películas de pH 2 tomaron color amarillo. Pareciera que estas películas en medio ácido no lograron alcanzar el pH del gel o que sus características estructurales favorecieron la difusión del indicador, de acuerdo con las observaciones anteriormente mencionadas.

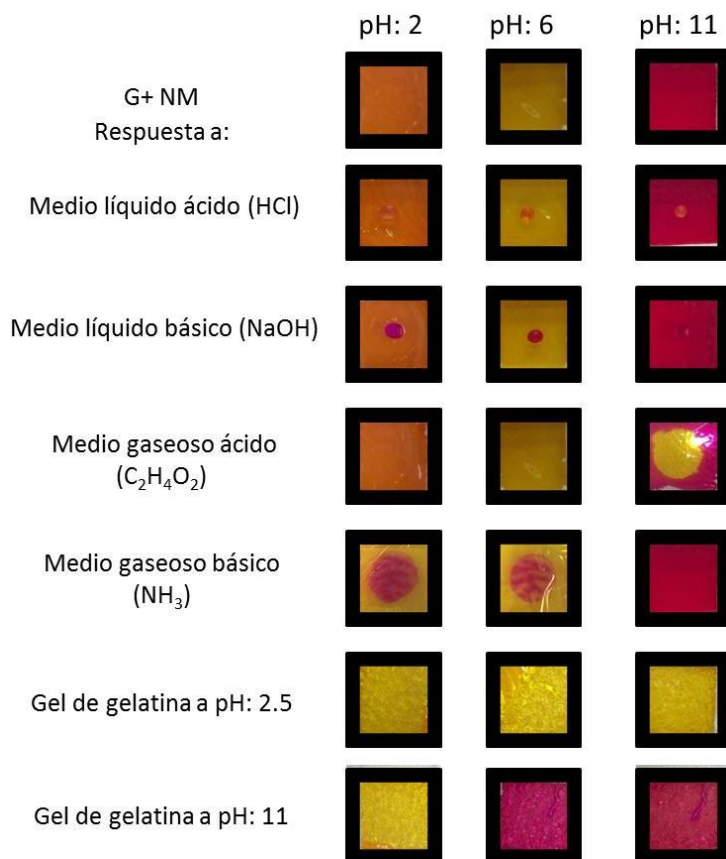


Figura III.1.6. Respuesta de películas de gelatina con agregado de naranja de metilo (G+NM) luego de estar en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a diferentes pHs.

En la Figura III.1.7 se muestra cómo las películas G+RN modifican su coloración con los pH y los distintos medios ensayados. Las películas modificaron su coloración mediante el agregado de una gota de ácido o de álcali, o cuando fueron sometidos a atmósferas gaseosas ácidas o alcalinas. Como se señaló anteriormente, los cambios de color en las películas fueron menos evidentes cuando se ponen en contacto con los medios semisólidos, a diferentes pH.

Las películas G+VBC mostraron un comportamiento similar al de las películas de G+RN (Figura III.1.8). Estas cambiaron su color inmediatamente después de estar en contacto con medios líquidos y gaseosos, ácidos y alcalinos. Estos cambios de color resultaron notables ya que las películas se volvieron de un amarillo tenue (en medio ácido) a azul (a pH neutro o alcalino) o viceversa, siendo estos cambios menos evidentes cuando se pusieron en contacto las películas con medios semisólidos.

III.1 Películas proteicas aditivadas con indicadores ácido-base sintéticos

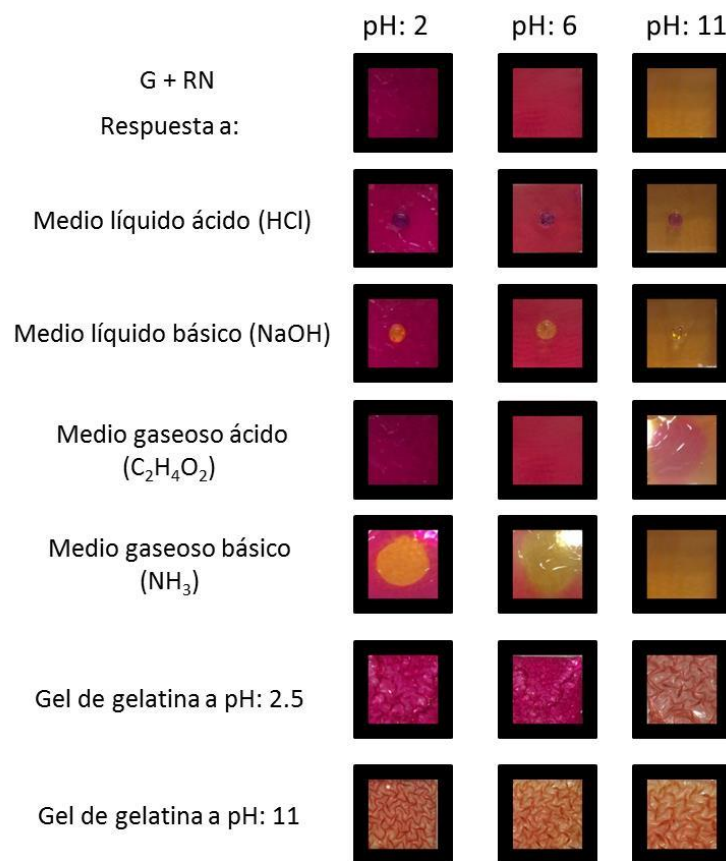


Figura III.1.7. Respuesta de películas de gelatina con agregado de rojo neutro (G+RN) luego de estar en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a diferentes pHs.

III.1 Películas proteicas aditivadas con indicadores ácido-base sintéticos

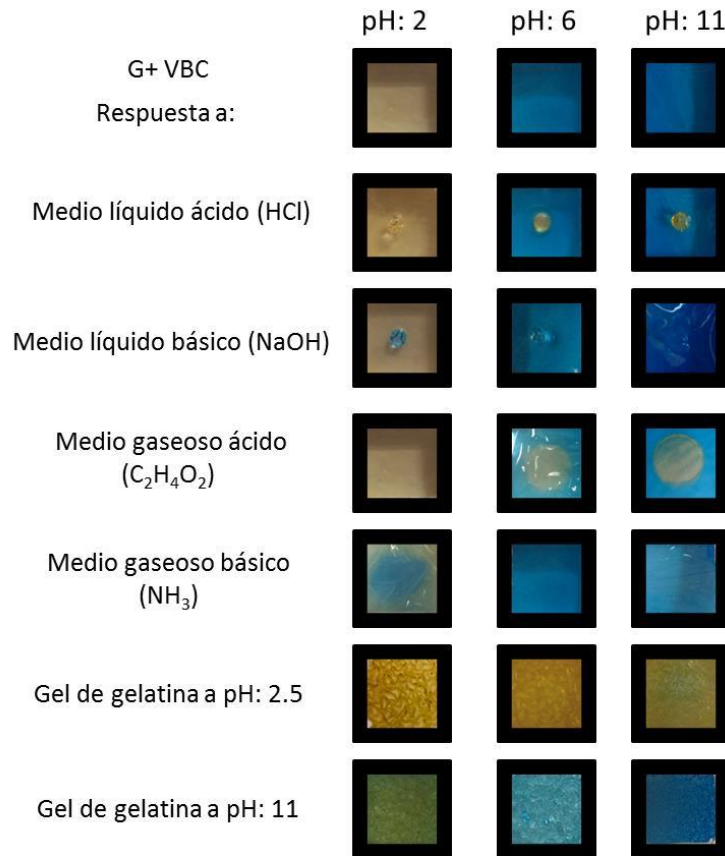


Figura III.1.8. Respuesta de películas de gelatina con agregado de verde de bromocresol (G+VBC) luego de estar en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a diferentes pHs.

El crecimiento microbiano a menudo influye en el pH de los alimentos envasados y/o de su entorno debido a los metabolitos producidos por los microorganismos, por ejemplo ácido láctico, sulfuro de hidrógeno y aminas volátiles (Biji y col., 2015; Han y Scanlon, 2005; Kerry y Butler, 2008). Estos materiales podrían indicar estos cambios de pH a través de un cambio en su coloración, e informar a los productores, vendedores y consumidores sobre la calidad y seguridad de los alimentos envasados.

Tabla III.1.3.A Variación de los parámetros de color de las películas de gelatina con agregado de naranja de metilo (G+NM) a pH: 2, 6 y 11 en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pH.

| | | pH 2 | | | pH 6 | | | pH 11 | | |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| G + NM | | L* | a* | b* | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| Respuesta frente a : | Medio líquido ácido | 85,9 ± 2,1 ^{d/z} | 35,1 ± 0,9 ^{d/y} | 68,9 ± 2,0 ^{d/y} | 82,2 ± 0,2 ^{e/y} | 8,8 ± 0,5 ^{c/x} | 77,5 ± 0,8 ^{f/z} | 50,9 ± 0,9 ^{a/x} | 50,0 ± 1,7 ^{c/z} | -20,1 ± 0,3 ^{a/x} |
| | Medio líquido básico | 69,7 ± 0,8 ^{b/y} | 39,61 ± 0,8 ^{e/y} | 30,1 ± 0,8 ^{b/y} | 76,6 ± 0,6 ^{c/z} | 12,7 ± 0,7 ^{d/x} | 55,4 ± 2,9 ^{b/z} | 54,9 ± 1,5 ^{b/x} | 50,5 ± 1,4 ^{c/z} | 26,2 ± 0,5 ^{c/x} |
| | Medio gaseoso ácido | 79,7 ± 0,3 ^{c/x} | 17,1 ± 0,3 ^{c/z} | 65,3 ± 0,1 ^{c/y} | 88,9 ± 1,4 ^{f/z} | -9,6 ± 0,1 ^{a/x} | 62,9 ± 0,4 ^{d/x} | 86,2 ± 0,1 ^{e/y} | 7,5 ± 0,1 ^{b/y} | 66,8 ± 1,3 ^{f/z} |
| | Medio gaseoso básico | 63,5 ± 1,0 ^{a/y} | 30,6 ± 2,3 ^{d/y} | 27,1 ± 1,4 ^{a/y} | 70,1 ± 0,6 ^{a/z} | 23,2 ± 0,9 ^{e/x} | 33,2 ± 0,4 ^{a/z} | 55,1 ± 0,9 ^{b/x} | 58,5 ± 0,7 ^{d/z} | -2,2 ± 0,6 ^{b/x} |
| | Gel de gelatina pH: 2,5 | 88,5 ± 0,7 ^{e/z} | -6,8 ± 0,2 ^{a/z} | 88,9 ± 0,7 ^{e/z} | 75,7 ± 0,4 ^{b/x} | -4,6 ± 0,3 ^{b/x} | 66,3 ± 0,2 ^{e/y} | 79,4 ± 0,4 ^{d/y} | -5,9 ± 0,2 ^{a/y} | 65,5 ± 0,4 ^{e/x} |
| | Gel de gelatina pH: 11 | 79,7 ± 0,3 ^{c/y} | -5,6 ± 0,2 ^{b/y} | 66,2 ± 0,7 ^{c/z} | 81,2 ± 0,1 ^{d/z} | -4,9 ± 0,2 ^{b/x} | 60,8 ± 1,1 ^{c/y} | 60,2 ± 1,9 ^{c/x} | 63,1 ± 0,7 ^{e/z} | 41,0 ± 0,7 ^{d/x} |

Tabla III.1.3.B Variación de los parámetros de color de las películas de gelatina con agregado de rojo neutro (G+RN) a pH: 2, 6 y 11 en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pH.

| | | pH 2 | | | pH 6 | | | pH 11 | | |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| G + RN | | L* | a* | b* | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| Respuesta frente a : | Medio líquido ácido | 42,1 ± 0,1 ^{a/x} | 63,1 ± 0,9 ^{f/z} | -5,1 ± 0,3 ^{b/x} | 57,9 ± 0,8 ^{a/y} | 45,2 ± 0,4 ^{d/y} | 5,9 ± 0,5 ^{a/y} | 64,5 ± 0,3 ^{a/z} | 18,1 ± 0,5 ^{e/x} | 16,1 ± 0,5 ^{b/z} |
| | Medio líquido básico | 55,4 ± 0,6 ^{e/x} | 41,5 ± 0,7 ^{b/z} | 22,7 ± 0,9 ^{e/x} | 67,5 ± 0,5 ^{d/y} | 31,9 ± 0,1 ^{c/y} | 31,9 ± 0,9 ^{c/y} | 79,7 ± 0,1 ^{c/z} | 5,2 ± 0,1 ^{b/x} | 54,9 ± 0,5 ^{f/z} |
| | Medio gaseoso ácido | 52,7 ± 0,3 ^{d/x} | 51,7 ± 0,3 ^{e/z} | 6,6 ± 0,4 ^{d/x} | 62,2 ± 0,9 ^{b/y} | 49,9 ± 0,4 ^{f/y} | 6,3 ± 0,5 ^{a/x} | 71,3 ± 0,6 ^{b/z} | 32,6 ± 0,4 ^{f/x} | 13,5 ± 0,6 ^{a/y} |
| | Medio gaseoso básico | 68,8 ± 0,7 ^{f/x} | 28,7 ± 1,3 ^{a/z} | 45,3 ± 0,7 ^{f/y} | 86,3 ± 0,2 ^{e/y} | -0,9 ± 0,4 ^{a/x} | 53,8 ± 0,7 ^{e/z} | 85,9 ± 0,6 ^{e/y} | 3,5 ± 0,2 ^{a/y} | 26,6 ± 0,6 ^{d/x} |
| | Gel de gelatina pH: 2,5 | 50,3 ± 0,7 ^{c/x} | 50,3 ± 0,7 ^{d/z} | -6,1 ± 0,1 ^{a/x} | 65,8 ± 0,6 ^{c/z} | 48,5 ± 0,6 ^{e/y} | 19,7 ± 0,2 ^{b/y} | 64,9 ± 0,9 ^{a/y} | 16,8 ± 0,8 ^{d/x} | 20,3 ± 0,7 ^{c/z} |
| | Gel de gelatina pH: 11 | 46,5 ± 0,9 ^{b/x} | 43,6 ± 0,9 ^{c/z} | 4,8 ± 0,5 ^{c/x} | 62,7 ± 0,6 ^{b/y} | 13,7 ± 0,2 ^{b/y} | 43,3 ± 0,5 ^{d/y} | 80,5 ± 0,1 ^{d/z} | 7,2 ± 0,1 ^{c/x} | 47,5 ± 0,4 ^{e/z} |

Tabla III.1.3.C Variación de los parámetros de color de las películas de gelatina con agregado de verde de bromocresol (G+VBC) a pH: 2, 6 y 11 en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pH

| | | pH 2 | | | pH 6 | | | pH 11 | | |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| G + VBC | | L* | a* | b* | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| Respuesta frente a : | Medio líquido ácido | 92,7±0,7 ^{e/y} | -6,9±0,02 ^{e/z} | 43,6±0,3 ^{e/z} | 78,4±0,8 ^{e/x} | -8,7±0,08 ^{d/y} | 15,1±0,8 ^{e/x} | 93,7 ± 1,7 ^{e/y} | -8,9 ± 0,03 ^{d/x} | 33,9 ± 0,9 ^{f/y} |
| | Medio líquido básico | 80,5±0,9 ^{c/z} | -9,5±0,1 ^{c/x} | 15,7±0,5 ^{b/y} | 70,3 ± 0,7 ^{b/y} | -14,3 ± 0,6 ^{a/z} | -33,2 ± 1,7 ^{b/x} | 60,5 ± 2,1 ^{b/x} | -11,4 ± 0,7 ^{b/y} | -10,1 ± 0,3 ^{b/z} |
| | Medio gaseoso ácido | 87,8±1,3 ^{d/y} | -6,3 ± 0,2 ^{f/x} | 32,9±0,05 ^{d/z} | 79,2±0,4 ^{f/x} | -13,0±0,1 ^{b/z} | 3,7±0,3 ^{d/x} | 90,5 ± 0,6 ^{d/z} | -5,0 ± 0,05 ^{e/y} | 20,9 ± 1,1 ^{c/y} |
| | Medio gaseoso básico | 70,3±0,1 ^{b/x} | -11,7±0,1 ^{a/y} | -28,8±0,1 ^{a/y} | 73,5±0,4 ^{d/y} | -12,8±0,2 ^{b/x} | -26,7±0,5 ^{c/z} | 73,3 ± 2,3 ^{c/y} | -10,1 ± 0,9 ^{c/z} | -30,2 ± 0,5 ^{e/x} |
| | Gel de gelatina pH: 2,5 | 95,2±0,5 ^{f/z} | -7,7±0,01 ^{d/x} | 44,6±0,5 ^{e/z} | 72,9±0,7 ^{c/x} | -8,0±0,6 ^{e/x} | 34,4±0,3 ^{f/y} | 88,7 ± 3,1 ^{d/y} | - 4,9 ± 1,1 ^{e/y} | 27,8 ± 2,1 ^{d/x} |
| | Gel de gelatina pH: 11 | 69,0±0,3 ^{a/z} | -10,6±0,3 ^{b/z} | 23,5±0,3 ^{c/z} | 59,2±0,2 ^{a/y} | -12,2±0,2 ^{c/y} | -40,8±0,2 ^{a/y} | 48,3 ± 1,1 ^{a/x} | -13,5 ± 0,4 ^{a/x} | -54,5 ± 0,2 ^{a/x} |

Los valores informados de cada película de gelatina son el promedio ± la desviación estándar (n = 9). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) entre los diferentes indicadores ácido-base para el mismo pH de la dispersión filmogénica, según el test de Tukey. Diferentes letras (w, x, y, z) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) entre los diferentes pH de la dispersión filmogénica para la misma formulación de película para cada parámetro, según el test de Tukey.

III.1.3.3 Efecto de la presencia de los indicadores ácido-base sintéticos y del pH de la dispersión filmogénica sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes

Independientemente de la presencia de los indicadores en las formulaciones, el pH de las dispersiones filmogénicas afecta el estado y la conformación de las proteínas. Por lo tanto afecta a las interacciones que pueden producirse durante la formación de la película entre las cadenas polipeptídicas y entre las proteínas y los otros componentes de la formulación. Las interacciones proteína-proteína implicadas en la estabilización de la matriz polimérica determinan el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrófilo-hidrófobo de las películas, y se correlacionan con sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y propiedades de barrera (Mauri y Añón, 2006 y 2008). En la Tabla III.1.4 se muestra el espesor, el contenido de agua (MC), la solubilidad en agua (S), la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la temperatura de transición vítrea (Tg) de las películas desarrolladas. No se observaron modificaciones en los espesores de las películas ($\approx 50 \mu\text{m}$) con la adición de indicadores ácido-base utilizados ($p > 0,05$) ni con el pH de la dispersión filmogénica ($p > 0,05$). El contenido de agua de las películas control (G) fue de $\approx 20\%$. La adición de NM y RN en las formulaciones disminuyó significativamente el contenido de agua de las películas resultantes (G+NM y G+RN) ($p < 0,05$) en todos los pH estudiados, mientras que la incorporación de VBC no modificó su contenido de agua respecto a las películas G ($p > 0,05$). La variación en el pH sólo modificó significativamente ($p < 0,05$) el contenido de humedad de las películas G y G+VBC. En ambos casos, las películas obtenidas a pH 6 presentan los mayores contenidos de humedad ($p < 0,05$).

Las películas control (G) mostraron valores de solubilidad en agua entre el 37 y el 49% dependiendo del pH de las dispersiones filmogénicas. Estos valores resultaron más bajos que otros valores informados en la literatura para películas de gelatina (Hanani y col., 2012). La adición de los indicadores ácido-base en las formulaciones causó diferentes efectos sobre la solubilidad en agua de las películas obtenidas. NM provocó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la solubilidad en agua de las películas resultantes, siendo este efecto más alto a pH 11 (disminuye $\approx 60\%$) que a pH 2 y 6 (disminuye $\approx 40\%$). RN no afectó a la solubilidad en agua de las películas de gelatina ($p > 0,05$) y VBC resultó con comportamientos diferentes en la solubilidad en agua en función del pH de las soluciones filmogénicas de las películas: aumentando $\approx 25\%$ a pH 11 ($p > 0,05$), y

disminuyendo $\approx 40\%$ a pH 6 ($p > 0,05$), sin modificarlo a pH 2 ($p < 0,05$). Las películas de gelatina de control y con los colorantes NM y RN a pH ácido fueron más solubles en agua que las obtenidas a pH neutro o alcalino ($p < 0,05$). Pero aquellas con VBC mostraron solubilidades en agua similares a pH 2 y 11, y valores más altos a pH 6 ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren diferentes grados de entrecruzamiento proteico que dependen de la presencia de los indicadores ácido-base y del pH de las dispersiones filmogénicas.

Tabla III.1.4 Espesor, contenido de humedad (MC), solubilidad en agua (S), permeabilidad al vapor de agua (WVP) y temperatura de transición vítrea (Tg) de las películas de gelatina control (G) y con agregado de naranja de metilo (G+NM), rojo neutro (G+RN) y verde de bromocresol (G+VBC) a pH 2, 6 y 11.

| Película | pH | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP.10 ¹¹ ($\text{gH}_2\text{O/s.m.Pa}$) | Tg ($^{\circ}\text{C}$) |
|----------|----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|
| G | 2 | 49,5 \pm 3,9 ^{a/x} | 19,2 \pm 0,5 ^{a/x} | 49,6 \pm 1,6 ^{a/x} | 7,63 \pm 0,84 ^{a/x} | -7,9 \pm 0,7 ^{a/x} |
| | 6 | 51,0 \pm 3,0 ^{a/x} | 22,1 \pm 0,6 ^{a/y} | 37,6 \pm 2,7 ^{a/y} | 6,54 \pm 0,34 ^{a/x} | -6,3 \pm 2,0 ^{a/x} |
| | 11 | 47,8 \pm 3,4 ^{a/x} | 21,5 \pm 0,3 ^{a/y} | 37,6 \pm 1,8 ^{a/y} | 7,96 \pm 0,36 ^{ab/x} | -6,8 \pm 0,7 ^{a/x} |
| G+NM | 2 | 45,4 \pm 2,2 ^{a/x} | 16,9 \pm 0,8 ^{b/x} | 30,7 \pm 2,9 ^{b/x} | 8,28 \pm 0,86 ^{a/x} | -7,3 \pm 1,0 ^{a/x} |
| | 6 | 48,1 \pm 2,3 ^{a/x} | 16,3 \pm 0,5 ^{b/x} | 23,2 \pm 1,4 ^{b/y} | 7,00 \pm 0,96 ^{a/x} | -5,1 \pm 0,5 ^{b/x} |
| | 11 | 51,1 \pm 3,0 ^{a/x} | 17,3 \pm 0,3 ^{b/x} | 15,2 \pm 0,1 ^{b/z} | 6,71 \pm 0,19 ^{a/x} | -6,9 \pm 0,5 ^{a/x} |
| G+RN | 2 | 49,7 \pm 3,3 ^{a/x} | 17,4 \pm 0,6 ^{b/x} | 53,5 \pm 4,4 ^{a/x} | 8,90 \pm 0,94 ^{a/x} | -7,7 \pm 0,5 ^{a/x} |
| | 6 | 50,2 \pm 1,8 ^{a/x} | 17,5 \pm 1,1 ^{b/x} | 38,1 \pm 1,9 ^{a/y} | 8,83 \pm 0,75 ^{a/x} | -5,7 \pm 1,2 ^{a/x} |
| | 11 | 50,7 \pm 1,9 ^{a/x} | 16,5 \pm 0,1 ^{b/x} | 34,1 \pm 1,0 ^{a/y} | 8,58 \pm 0,78 ^{bc/x} | -6,7 \pm 0,1 ^{a/x} |
| G+VBC | 2 | 46,0 \pm 2,1 ^{a/x} | 20,5 \pm 0,7 ^{a/x} | 51,3 \pm 0,9 ^{a/x} | 9,12 \pm 0,13 ^{a/xy} | -6,2 \pm 1,1 ^{a/x} |
| | 6 | 49,5 \pm 3,7 ^{a/x} | 23,3 \pm 1,2 ^{a/y} | 21,5 \pm 0,5 ^{b/y} | 8,62 \pm 0,25 ^{a/x} | -4,2 \pm 0,5 ^{b/x} |
| | 11 | 49,4 \pm 6,5 ^{a/x} | 20,3 \pm 0,2 ^{a/x} | 49,8 \pm 5,6 ^{c/x} | 9,90 \pm 0,70 ^{c/y} | -6,5 \pm 1,1 ^{a/x} |

Los valores informados de cada película de gelatina son el promedio \pm la desviación estándar ($n = 9$ para espesor; $n = 3$ para MC, S y WVP; $n = 2$ para Tg). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes pH de la dispersión filmogénica para la misma formulación, según el ensayo de Tukey. Diferentes letras (w, x, y, z) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes indicadores ácido-base para el mismo pH de la dispersión filmogénica, según el test de Tukey

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas ($\approx 8,2 \cdot 10^{-11} \text{ g H}_2\text{O s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) con la adición de los indicadores ácido-base o cambiando el pH de las dispersiones filmogénicas; a diferencia de los resultados obtenidos de solubilidad en agua y contenido de humedad.

Las propiedades mecánicas de las películas de gelatina desarrolladas se presentan en la Figura III.1.9. Las películas control (G) mostraron moderada resistencia a la tracción, módulo elástico, y elongación a la rotura. Estas propiedades se vieron afectadas tanto por la presencia y el tipo de indicador ácido-base ($p < 0,05$) como por el pH inicial de la dispersión filmogénica ($p < 0,05$). La incorporación de NM o RN en las formulaciones mejoró las propiedades mecánicas de estos materiales. Estas películas coloreadas mostraron una mayor resistencia a la tracción y módulo de *Young*, aunque una menor elongación a la rotura que las películas control (G) ($p < 0,05$). Estas mejoras fueron más notorias a pH neutro y alcalino que a pH ácido ($p < 0,05$). Las películas G+RN mostraron las mejores propiedades mecánicas de las películas desarrolladas. En particular, la adición de RN a las dispersiones de gelatina a pH 11 resultó en un marcado aumento de resistencia a la tracción ($\approx 400\%$) y del módulo de *Young* ($\approx 2000\%$) ($p < 0,05$), en detrimento de su elongación a la rotura ($\approx 40\%$ de disminución) ($p < 0,05$). Además, las películas G+VBC obtuvieron propiedades mecánicas similares respecto a las películas control ($p > 0,05$). Cabe señalar que las películas de gelatina con o sin los indicadores ácido-base obtenidas a pH 6 y 11 mostraron una mayor resistencia a la tracción que las preparadas a partir de dispersiones filmogénicas ácidas ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que los indicadores ácido-base estudiados, con diferentes estructuras químicas (mostradas en la Tabla III.1.1), podrían interactuar de manera diferente con la matriz proteica. La adición de NM y RN a las formulaciones parece favorecer el entrecruzamiento de las proteínas, dando lugar a películas menos solubles en agua, con menor contenido de humedad y sin afectar su permeabilidad al vapor de agua. Mientras que la adición de VBC no parece interferir en las matrices proteicas obtenidas a pH 6 y 11, pero ejerce cierto efecto plastificante en las películas ácidas.

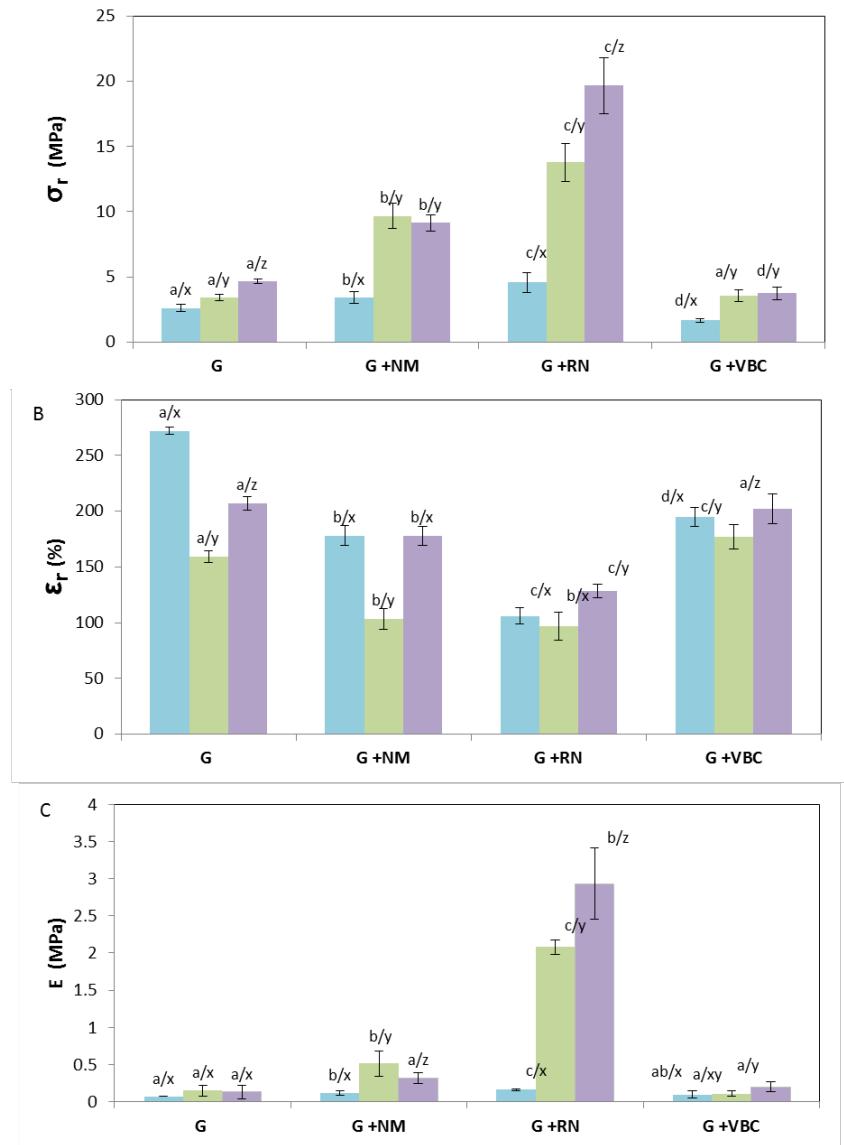


Figura III.1.9 Propiedades mecánicas de las películas de gelatina control (G) y con agregado de naranja de metilo (G+NM), rojo neutro (G+RN) y verde de bromocresol (G+VBC) a pH: 2 (■), 6 (■) y 11 (■). **A)** Tensión a la rotura (σ_r). **B)** Elongación a la rotura (ϵ_r). **C)** Módulo de Young (E).

Los valores informados de cada película son los promedios \pm la desviación estándar ($n = 12$). Diferentes letras (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes indicadores ácido-base para el mismo pH de la dispersión filmogénica, según el test de Tukey. Diferentes letras (w, x, y, z) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes pH de la dispersión filmogénica para la misma formulación de película, según el ensayo de Tukey.

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) de las películas estudiadas se presentan en la Tabla III.1.4. Todas las películas mostraron sólo un valor de T_g lo que da indicio de la homogeneidad de las películas obtenidas (Tapia-Blácido y col., 2007). Ni la presencia de los indicadores ácido-base, ni el pH de las dispersiones filmogénicas modificaron la T_g de los

materiales ($p > 0,05$), excepto para las películas G+NM y G+VBC a pH 6 que mostraron una Tg ligeramente mayor que las películas de control ($p < 0,05$). Estos resultados no muestran el entrecruzamiento o el posible efecto plastificante sobre la matriz proteica sugerido anteriormente en el análisis de contenido de humedad, solubilidad en agua y propiedades mecánicas de las películas. Las diferencias en el contenido de humedad de las películas también está afectando el valor de Tg. Estos resultados sugieren que las moléculas de NM y RN podrían estar actuando como *entanglements* físicos y/o químicos que no modifican la movilidad de las cadenas polipeptídicas.

III.1.4 Conclusiones

Se formaron películas de gelatina, capaces de indicar cambios en el pH del medio a través de la adición de indicadores ácido-base sintéticos a su formulación: naranja de metilo, rojo neutro y verde de bromocresol. Todas las películas modificaron su color de forma reversible cuando se colocaron en contacto con medios líquidos, gaseosos y semisólidos a diferentes pH, sin observarse interferencias de la matriz proteica. La adición de estos compuestos también modificó las propiedades fisicoquímicas de los materiales resultantes. En particular, el agregado de naranja de metilo y rojo neutro a la formulación provocó un aumento en la resistencia mecánica y una disminución en la solubilidad de las películas resultantes, sin afectar su permeabilidad al vapor de agua y su capacidad de respuesta frente a cambios de pH del medio al que se la expone, siendo estos efectos más pronunciados a pH neutros y alcalinos.

Estos materiales inteligentes, utilizados como envases de alimentos o recubrimientos, podrían informar sobre la seguridad y calidad de los productos en sistemas cuyo modo de deterioro es acompañado por un cambio de pH del medio circundante, como es el caso del crecimiento microbiano.

La evidencia de que la matriz proteica no interfirió con la decoloración de los indicadores ácido-base al estar en contacto con un medio de pH diferente, motivó la evaluación de estos materiales en sistemas reales y la búsqueda de colorantes de grado alimenticio que pudieran sustituir a los sintéticos analizados en esta sección.

III.2. Películas proteicas capaces de indicar deterioro microbiano en carnes a través de su respuesta frente a cambios de pH.

III.2.1 Introducción

Estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) estiman que a nivel mundial más del 30% de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia durante su almacenamiento, distribución y/o consumo. Las mayores pérdidas corresponden a productos cárnicos (30%), le siguen las frutas y verduras (19%) y los productos lácteos (17%) (Buzby y col., 2014).

En particular, el deterioro de los productos cárnicos se debe principalmente al desarrollo microbiano y, en menor medida, a reacciones de proteólisis y autooxidación lipídica. El desarrollo de microorganismos de deterioro y/o patógenos puede modificar las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y nutricionales de los productos contaminados así como también puede representar un problema de salud pública al ser capaz de causar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) (Realini y col., 2014).

Por lo tanto, para diseñar un indicador de deterioro microbiano resulta necesario conocer los metabolitos indicativos de la calidad del alimento. En los productos cárnicos, los metabolitos que se pueden utilizar como indicativos de calidad son glucosa, ácidos orgánicos (por ejemplo ácido láctico), compuestos nitrogenados volátiles, aminas biógenas (como tiramina, cadaverina, putrescina e histamina), dióxido de carbono, productos de degradación del ATP y compuestos sulfurados.

Varios indicadores de deterioro microbiano han sido descritos (Han y col., 2005; Kerry y col., 2006). En la mayoría de ellos se produce un cambio de coloración en el material debido a la presencia de al menos uno de los metabolitos citados anteriormente (Smolander, 2002; Realini y col., 2014).

Un indicador ácido-base frecuentemente empleado en la industria cárnica es el azul de bromotimol para monitorear la formación de dióxido de carbono generado durante el crecimiento microbiano. Gorski y col. (2011) incluyeron diferentes indicadores ácido-base como azul de xilenol, púrpura de bromocresol, verde de bromocresol, rojo de cresol, fenolftaleína, rojo de fenol, rojo de metilo, rojo neutro, alizarina, y combinaciones de ellos

en películas de polietileno utilizadas para envasar pollo. Pacquit y col. (2007, 2006) y Kuswandi y col. (2012 y 2014) desarrollaron indicadores capaces de monitorear aminas volátiles durante el deterioro de pescado agregando distintos indicadores (verde de bromocresol, curcumina, amarillo de nitrazina, rojo de metilo, rojo cresol, rojo neutro y rojo fenol) a distintas matrices poliméricas (por ejemplo acetato de celulosa, celulosa bacteriana, polianilina y PET). Smolander (2002 y 2008) desarrolló un indicador de deterioro basado en la reacción entre el sulfuro de hidrógeno, un metabolito microbiano, y la mioglobina para dar sulfomioglobina de color verde. Comercialmente existen etiquetas (FreshTag®, COX Technologies) que indican presencia de aminas volátiles producidas por deterioro de pescado (Hogan y Kerry, 2008). Como puede observarse, son muy pocos los envases inteligentes con polímeros biodegradables.

Para lograr una aplicación satisfactoria de los materiales inteligentes hay que encontrar la combinación alimento-indicador de deterioro adecuada. Con la intención de verificar si las matrices proteicas aditivadas con colorantes sintéticos desarrolladas lograban cambiar de color frente a cambios de pH producidos por sistemas reales, se intentó inicialmente disminuir los amplios rangos de viraje que presentan los indicadores ácido-base. Las mezclas binarias de estos indicadores ácido-base podrían ser una alternativa para provocar dicho efecto e incluso modificar el pH al cual se produce el viraje (Sabnis, 2007).

El **objetivo** de este capítulo fue desarrollar películas de gelatina con capacidad de modificar su coloración frente a cambios de pH a través del agregado de mezclas de indicadores ácido-base, evaluar su aplicación como indicadores de deterioro microbiano en carnes; y analizar el efecto que los aditivos producen sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

III.2.2 Materiales y métodos

III.2.2.1 Materiales

Como fuente proteica se utilizó gelatina bovina comercial (Royal, Kraft Foods Argentina) y como plastificante, glicerol (Anedra, Argentina). Los indicadores ácido-base sintéticos utilizados fueron: naranja de metilo (NM), rojo neutro (RN) y verde de bromocresol (VBC). Para la evaluación en sistemas reales, se utilizaron carnes de distinto origen: carne vacuna (picada o entera), porcina (entera), de pollo (pechuga), y de pescado (merluza), adquiridas en un comercio de la zona.

III.2.2.2 Relación entre recuento microbiano y pH de muestras cárnicas almacenadas en refrigeración

Se prepararon discos (de 10 g) de carne vacuna entera y picada, porcina, de pollo, y de pescado. Los discos de carne se colocaron en bolsas estériles para su almacenamiento refrigerado a 4°C durante 4 días. Se empleó una bolsa estéril para cada muestra. Diariamente se determinó el pH de las muestras y se realizó el recuento de microorganismos totales.

El pH en cada muestra de carne se determinó empleando un pHmetro de punción. Los valores informados corresponden al promedio de nueve determinaciones sobre cada muestra.

Para los recuentos microbianos, se adicionaron a los discos de carne 90 ml de *buffer* fosfato salino estéril (PBS: 0,28M de cloruro de sodio, 5,4 mM de cloruro de potasio, 16 mM de fosfato de sodio dibásico, y 3mM de fosfato de potasio monobásico; pH: 7,4) y se los colocó en bolsas estériles para ser tratadas en Stomacher (modelo 400, Laboratory blander, E.E.U.U.). Allí se homogeneizaron: 30 segundos a velocidad baja, 30 segundos a velocidad normal y 60 segundos a velocidad alta. Se tomaron alícuotas del homogeneizado y se realizaron diluciones seriadas para ser sembradas en placas de Petri con agar nutritivo (Biokar, Argentina) bajo flujo laminar. Se tomaron 100 µl de las distintas diluciones y se dispersaron sobre el agar con perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron 24 h a 37°C en estufa. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) sólo en las placas que contenían entre 30 y 300, y se calculó la cantidad de UFC presentes en 1 g de cada muestra de carne estudiada. El ensayo se realizó durante 4 días y se obtuvieron valores por triplicado para cada tipo de carne estudiada.

III.2.2.3 Formación de las películas

En esta sección se trabajó con películas de gelatina preparadas de manera idéntica a la técnica descrita en la sección III.1.2.2 pero utilizando también mezclas de los distintos indicadores ácido-base sintéticos. Tal como se describe en la Tabla III.2.1. Las mezclas NM+VBC, RN+NM y VBC+RN se realizaron en diferentes proporciones 25:75, 50:50 y 75:25 (v/v). El pH de todas las dispersiones filmogénicas se ajustó en 6. Un volumen de 10 ml de cada dispersión se moldeó en placas de Petri (64 cm²) y se secó en estufa de convección

forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60°C durante tres horas. Las películas resultantes fueron acondicionadas 48 h a 20°C y 58% HR previo a su caracterización.

Tabla III.2.1. Composición de las dispersiones filmogénicas de gelatina con las distintas mezclas de indicadores acido-base sintéticos.

| Mezcla de colorantes | Proporción de colorantes (v/v) | Concentración de gelatina (p/v) | Concentración Glicerol (p/p respecto a gelatina) | pH |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|----|
| NM+ RN | 50:50 | 5 % | 25 % | 6 |
| VBC+ RN | 50:50 | | | |
| NM+ VBC | 50:50 | | | |
| | 75:25 | | | |
| | 25:75 | | | |

III.2.2.4 Caracterización de las películas

Las películas desarrolladas fueron caracterizadas por sus propiedades fisicoquímicas: espesor, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas en tracción, según la metodología descrita en la sección III.1.2.3. Además se evaluó la capacidad de respuesta de los materiales desarrollados tanto al ponerlos en contacto con distintos sistemas *buffer* cubriendo el rango completo de pH (1-14) como al emplearlos en el envasado de productos cárnicos, en particular pescado. Ambas metodologías se describen a continuación.

III.2.2.5 Respuesta de las películas a los cambios de pH

Se enfrentaron las películas a sistemas *buffer* de diferentes pH (de 1 a 14). Utilizando *buffer* fosfato de pH 1 a 7 y *buffer* borato de pH 7 a 14 con una fuerza iónica de 0,15 M (Ross, 1991). Las respuestas de los materiales frente a los cambios de pH fueron registradas por medio de fotografías tomadas con una cámara digital (Kodak M853, EE.UU.).

Además se evaluó la respuesta de las películas frente a medios líquidos, semisólidos y gaseosos, ácidos y alcalinos según se describió en la sección II.1.2.4.

III.2.2.6 Respuesta de las películas a los cambios de pH durante el almacenamiento refrigerado de productos cárnicos

Se colocaron discos de carne de pescado (de 6 cm de diámetro) en cajas de Petri y se envasaron conteniendo la película de gelatina con la mezcla de indicadores ácido-base seleccionada. Esto se realizó de dos maneras, que se esquematizan en la Figura III.2.1:

i) Un disco de la película se puso sobre la carne de pescado y se cubrió empleando un film de PVC transparente por encima, sin estar éste en contacto con la película (Figura III.2.1 B), por lo que la película está en contacto directo con la carne de pescado y con el espacio de cabeza del envase.

ii) Un disco de la película se puso sobre la parte interior del film de PVC transparente, sin estar en contacto directo con el producto cárnico (Figura III.2.1 C). De este modo, la película sólo está en contacto con el espacio de cabeza del envase.

Como control se empleó un sistema idéntico al descrito pero sin agregar la película proteica (Figura III.2.1 A). Estas muestras se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta el fin de su vida útil (como máximo 3 días). Diariamente, se determinó el color de la película ensayada empleando un colorímetro (Kónica Minolta Chroma Meter CR-400, Japón), se registraron los cambios con cámara fotográfica (Konica M853, EE.UU) y se midió el pH de la carne y el de las películas con un pHmetro de punción.

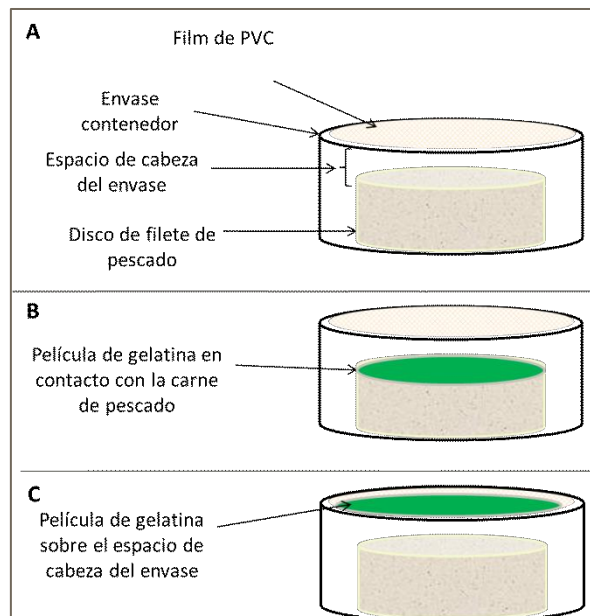


Figura III.2.1. Diagrama del envasado de carne de pescado sin emplear película proteica (A) y empleando la película de gelatina con la mezcla de indicadores ácido-base seleccionada en contacto directo (B) con la carne y el espacio de cabeza del envase, (C) sólo con el espacio de cabeza del envase.

III.2.2.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$ utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statgraphics, EE.UU.).

III.2.3 Resultados y discusión

III.2.3.1 Relación entre el desarrollo microbiano en muestras cárnicas y la variación de su pH

Se determinó la correlación entre el desarrollo microbiano y el pH de las muestras cárnicas estudiadas para luego seleccionar la formulación más apropiada del material proteico a utilizar como envase inteligente.

Según datos del Código Alimentario Argentino (CAA) la carne vacuna no puede comercializarse con un pH superior a 5,2 (Capítulo VI, Artículo 255 bis) y en el artículo 272 del mismo capítulo menciona que tampoco podrá comercializarse la carne de pescado con un pH superior a 7,5. Se partió de carnes frescas, en buenas condiciones microbiológicas, con apariencia y color aceptables (Becker 2000). Los valores iniciales de pH fueron similares a los presentados en bibliografía para carnes de vaca (CAA; Audisio, 2007), pescado (Farías Vera y col., 2013), pollo (Machado de Melo y col., 2012), y cerdo (González y col., 2014).

Todas las muestras en estudio, incluidas las de pescado que habitualmente se distribuyen y comercializan congeladas para extender su vida útil, fueron almacenadas en refrigeración. En la Tabla III.2.2 y en la Figura III.2.2 se muestran los resultados del recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos totales por gramo de carne estudiada y la variación de su pH, durante el almacenamiento refrigerado. En todos los casos, la carga microbiana y el pH de los productos cárnicos fueron aumentando en función del tiempo de almacenamiento.

Para las carnes vacunas, tanto entera como picada y de pollo, el cambio de pH fue progresivo frente al paso del tiempo ($\approx 0,1-0,5$ unidades por día), como también el crecimiento de microorganismos. Sólo el pH de las muestras de carne de cerdo aumentó

considerablemente (de 1,4 unidades de pH) entre los días 3 y 4 de almacenamiento refrigerado. Sin embargo, en esta condición el desarrollo microbiano ya ha sido extensivo y la apariencia del producto (color y olor) da indicio del deterioro sufrido.

Para el ensayo realizado con carne de pescado, durante los primeros dos días el pH varió de 6,4 a 7,4 (en 1 unidad de pH) y se correspondió con un aumento de dos órdenes de magnitud en el recuento de microorganismos totales. La carne de pescado estudiada no podría ser consumida luego del tercer día de almacenamiento refrigerado, en donde el pH llega a 7,7, ya que así lo establece el CAA.

Esta importante variación de pH en la carne de pescado que está acompaña por desarrollo microbiano fue razón por la cual se eligió este tipo de carne para evaluar el cambio de coloración de las películas de gelatina en un sistema real.

Tabla III.2.2. Recuento de UFC totales por gramo de carne y valores de pH en función del tiempo de almacenamiento refrigerado a 4°C de carne vacuna picada y entera, carne de pescado, de pollo y de cerdo.

| Muestra | | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
|---------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Carne vacuna picada | pH | 5,4±0,02 ^a | 5,8±0,01 ^b | 5,9±0,01 ^c | 5,9±0,05 ^c |
| | log UFC/g | 5,7±0,03 ^a | 5,7±0,1 ^a | 7,8±0,3 ^b | 8,1±0,3 ^b |
| Carne vacuna entera | pH | 5,1±0,02 ^a | 5,3±0,04 ^b | 5,6±0,05 ^c | 5,7±0,07 ^c |
| | log UFC/g | 5,8±0,02 ^a | 6,1±0,1 ^a | 6,6±0,1 ^b | 8,2±0,2 ^c |
| Carne de pollo | pH | 5,9±0,03 ^a | 6,0±0,10 ^a | 6,5±0,20 ^b | 6,6±0,10 ^b |
| | log UFC/g | 6,0±0,2 ^a | 6,8±0,8 ^a | 7,6±0,9 ^a | 7,8±0,8 ^a |
| Carne de cerdo | pH | 5,6±0,04 ^a | 5,7±0,06 ^a | 6,0±0,10 ^a | 7,4±0,30 ^b |
| | log UFC/g | 6,7±0,1 ^a | 6,8±0,5 ^a | 7,3±0,8 ^a | 8,1±0,8 ^a |
| Carne de pescado | pH | 6,4±0,02 ^a | 7,4±0,05 ^b | 7,7±0,06 ^c | 7,8±0,10 ^c |
| | log UFC/g | 5,7±0,03 ^a | 7,3±0,1 ^b | 7,6±0,1b ^c | 8,0±0,3 ^c |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en las mismas filas (a, b) indican diferencias significativas (p < 0,05) de acuerdo al test de Tukey.

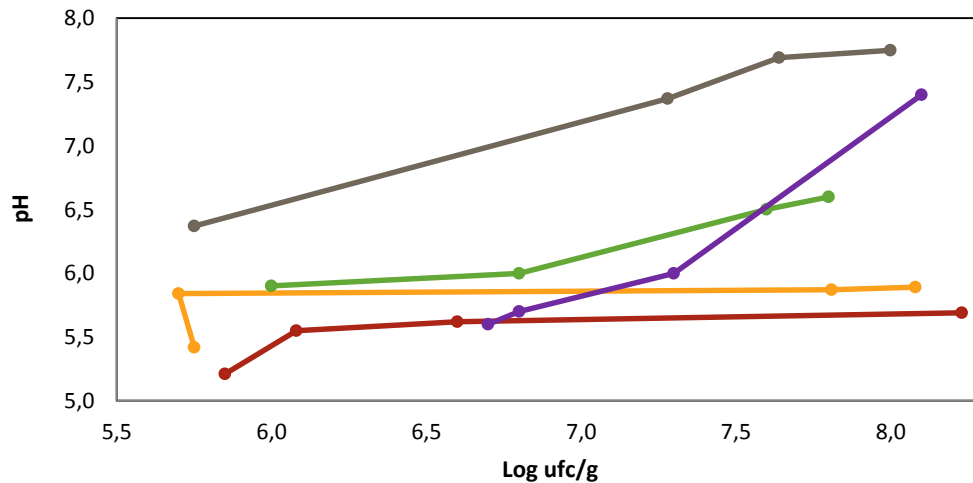


Figura III.2.2. Relación entre el desarrollo microbiano (log UFC/g) y el pH de carnes: — vacuna picada, — vacuna entera, — de pescado, — de pollo y — de cerdo durante su almacenamiento refrigerado a 4°C.

III.2.3.2 Selección de la formulación del material a utilizar para el envasado inteligente de pescado

Una película que cambie su coloración en pH cercanos a 7,4 podría servir como indicador de deterioro en carnes de pescado. Dicho cambio de coloración debe ser notorio para que pueda indicarle visualmente al productor, distribuidor, comerciante o consumidor el deterioro. Por esta razón además de considerarse las películas aditivadas con los indicadores ácido-base antes estudiados, también se analizaron sus mezclas. En la Figura III.2.3 se muestra la apariencia de las películas de gelatina obtenidas con los indicadores ácido-base puros y con sus mezclas binarias (50:50 v/v), todas a pH 6. Todas las películas resultaron traslúcidas, pero con diferente coloración de acuerdo con los indicadores inmersos en su matriz. Con la mezcla (RN+NM) las películas resultaron con una coloración naranja-rojiza. Para la mezcla (VBC+RN) no se pudo lograr una buena homogeneización de los colorantes (incluso si se aumentaba el tiempo de agitación) que se vio reflejado en la formación de la película, y por lo tanto su coloración violeta resultó heterogénea. Con la mezcla (VBC+NM) se logró una buena homogeneización obteniéndose películas de color verde.

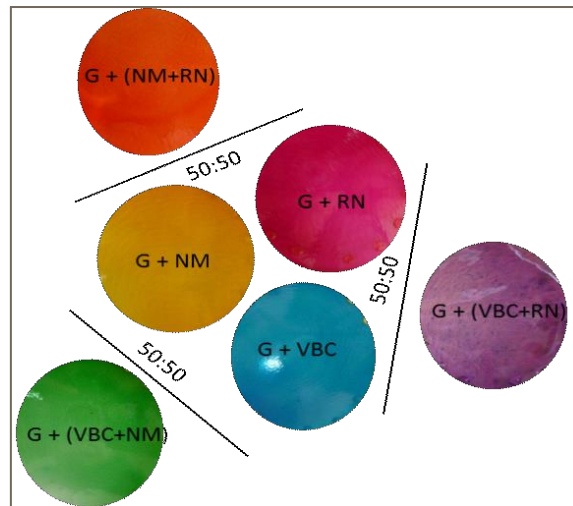


Figura III.2.3. Fotografías de las películas con los indicadores ácido-base puros: G+NM, G+VBC y G+RN y sus respectivas mezclas en proporción 50:50: G+(NM+RN), G+(VBC+NM) y G+(VBC+RN), todas a pH 6.

En la Figura III.2.4 se presenta el cambio de coloración de estas películas frente a los diferentes *buffers* ensayados desde pH: 1 a pH: 14. Las películas de gelatina con los indicadores ácido-base puros G+NM, G+VBC y G+RN mostraron los cambios de coloración ya mencionados en la sección III.1.3.2 y se indican en Figura III.2.4 A. Al enfrentar las películas con las distintas mezclas de indicadores ácido-base a sistemas *buffers* con distintos valores de pH, se obtuvieron respuestas diferentes según la película analizada (Figura III.2.4 B). En las películas G+(RN+NM), el cambio de coloración observado no fue visible a simple vista entre los diferentes *buffers* utilizados, ya que la coloración viró del rojo a rosa (entre los pH: 1 y 2) o del rojo al naranja (entre los pH: 10 y 11). Esto no sería útil para el desarrollo de un envase inteligente ya que dificultaría la identificación del cambio de coloración para el consumidor. Para las películas G+(VBC+RN) se observó una modificación de la coloración a pH: 1, de color violeta a rosado, y otra modificación entre los pH 9 y 10 a color amarillo. Si bien se observaron estos dos cambios de coloración, al no ser uniformes las películas se dificulta mucho su observación. Por lo tanto esta formulación tampoco serviría para ser estudiada en el desarrollo de envases inteligentes. La coloración verde de las películas G+(VBC+NM) cambió a amarillo a pH < 3 y a color violeta a pH > 7 (Figura III.2.3.B). Estos cambios de coloración son notorios y cercanos a los cambios de pH que sufre la carne de pescado en su deterioro.

III.2. Películas proteicas capaces de indicar deterioro microbiano en carnes a través de su respuesta frente a cambios de pH.

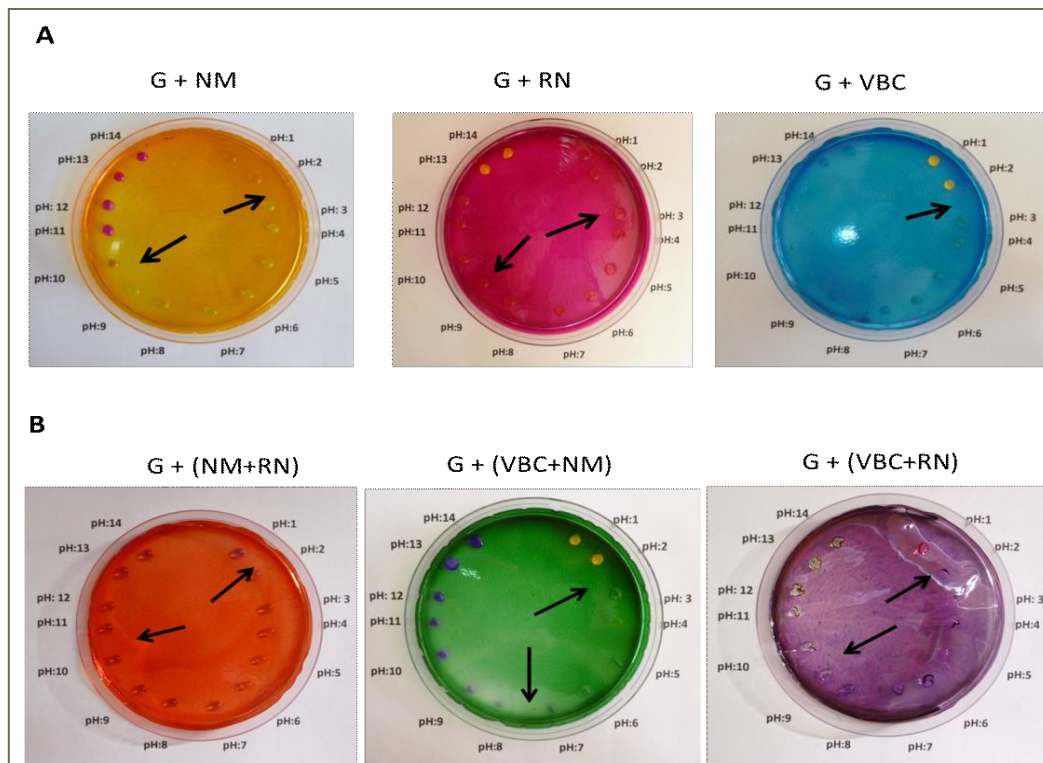


Figura III.2.4 Respuestas a los cambios de pH con distintos sistemas *buffer* de pH: 1 a 14 de las películas con los indicadores ácido-base puros: **A.** G+NM, G+RN y G+VBC, y sus respectivas mezclas binarias en proporción 50:50: **B.** G+(NM+RN), G+(VBC+NM) y G+(VBC+ RN), todas a pH 6.

Para modificar aún más el rango de viraje del indicador y obtener un cambio de pH más cercano al que alcanzan las carnes en su deterioro se evaluaron otras mezclas de indicadores ácido-base NM+VBC, pero esta vez con diferentes proporciones: 75: 25 y 25: 75, además de la ya ensayada -50: 50-. Se analizó la sensibilidad considerando el rango de mezclas completo. En la Figura III.2.5 se muestran las películas con estas nuevas formulaciones de mezclas G+(NM+VBC). Estas resultaron en distintos tonos verdes según la relación de los indicadores NM y VBC.

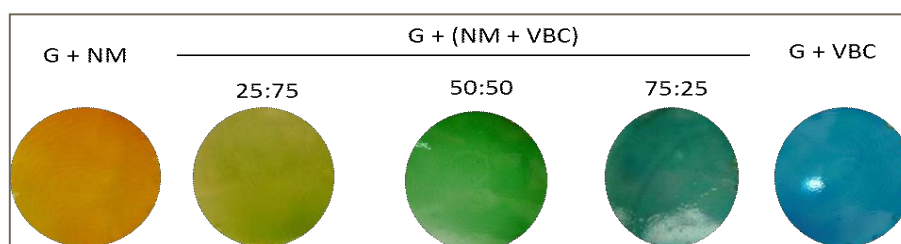


Figura III.2.5 Apariencia de películas con indicadores ácido-base puros: G+NM y G+VBC y con mezclas de los indicadores NM y VBC en diferentes proporciones: 25:75, 50:50 y 75:25.

En la Figura III.2.6 se muestran las respuestas frente a distintos *buffers* de las películas con mezcla de indicadores ácido-base NM+VBC en diferentes proporciones: 25:75, 50:50 y 75:25. Todas las películas modificaron su coloración al enfrentarlas a los diferentes sistemas *buffers*: 75: 25; modificó su color a violeta al enfrentarse a *buffers* con $\text{pH} > 8$ y 25: 75 también tornó su coloración a violeta, pero a $\text{pH} > 9$. Ambas modificaron su coloración a amarillo a $\text{pH} < 1$ (Figura III.2.6 A y C). Como estos cambios en la coloración no se encuentran dentro de los valores de pH a los que se modificaban las muestras de carne ensayadas, estas películas se descartaron para su posterior análisis y se siguió trabajando con G+(NM+VBC) 50: 50, a partir de ahora llamada G+(NM+VBC). Posteriormente, se caracterizó esta muestra ya que el cambio de coloración en esta formulación (Figura III.2.6.B) –detallado previamente- podría indicar el cambio de pH en el deterioro de la carne de pescado.

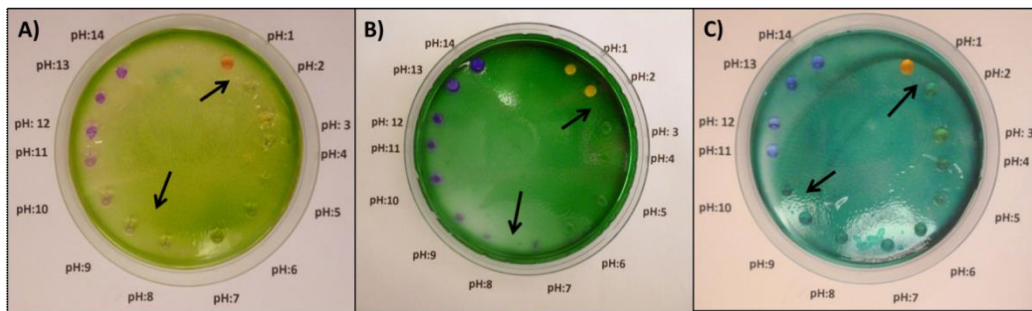


Figura III.2.6. Películas de gelatina aditivadas con mezclas de indicadores ácido-base NM+VBC en distintas proporciones: A) 75: 25, B) 50: 50 y C) 25: 75 enfrentadas a distintos sistemas *buffer* de pH 1 a 14.

III.2.3.3 Propiedades fisicoquímicas de la película de gelatina aditivada con una mezcla de indicadores ácido-base NM+ VBC.

En la Tabla III.2.3 se presenta la susceptibilidad al agua de la formulación seleccionada y en la Figura III.2.7 sus propiedades mecánicas. Se la compara con las de los materiales proteicos aditivados con los indicadores ácido-base puros. Estos valores coinciden con los presentados en la sección III.1.3.3.

Las películas obtenidas con la mezcla de indicadores ácido-base presentaron los valores más altos de espesor, solubilidad en agua y WVP, y un contenido de agua con valor intermedio comparado con el de las películas que contienen sólo un indicador ácido-base en su formulación. La solubilidad en agua de las películas G+(NM+VBC) fue $\approx 50\%$ mayor

que las otras dos formulaciones. Al igual que la permeabilidad al vapor de agua que tuvo valores entre un 15 y 40% mayores a las películas con un único indicador ácido-base en su matriz. La incorporación de la mezcla de estos indicadores generó una matriz menos compacta, pero más soluble y permeable al vapor de agua.

Tabla III.2.3. Espesor, contenido de agua (MC), solubilidad en agua (S) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las muestras G+NM, G+VBC y G+(VBC+ NM), todas a pH: 6.

| Película | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP ($\cdot 10^{11} \text{ g H}_2\text{O s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| G+NM | 48,1 \pm 2,3 ^a | 16,3 \pm 0,5 ^a | 23,2 \pm 1,4 ^a | 7,0 \pm 0,9 ^a |
| G+VBC | 49,5 \pm 3,7 ^a | 23,3 \pm 1,2 ^b | 23,3 \pm 1,2 ^a | 8,6 \pm 0,2 ^b |
| G+(NM+VBC) | 57,9 \pm 3,9 ^b | 20,9 \pm 0,1 ^c | 35,4 \pm 1,1 ^b | 9,9 \pm 0,4 ^c |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Las películas G+NM presentaron la mayor ($p < 0,05$) tensión a la rotura -con valores de 9,5 MPa-, mientras que las películas G+VBC presentaron valores de 3,5 MPa (Figura III.2.7). Cuando se incorporó la mezcla de indicadores ácido-base a la formulación, el valor de tensión a la rotura disminuyó a 1,5 MPa. El módulo de *Young* mostró la misma tendencia, por lo que G+(NM+ VBC) presentó el menor valor. Sin embargo, respecto a la elongación la tendencia es la inversa. Las películas con la mezcla binaria de los colorantes presentaron los mayores valores. Obteniéndose valores $\approx 50\%$ o $\approx 25\%$ menores para G+NM y G+VBC respectivamente comparados con G+(NM+ VBC).

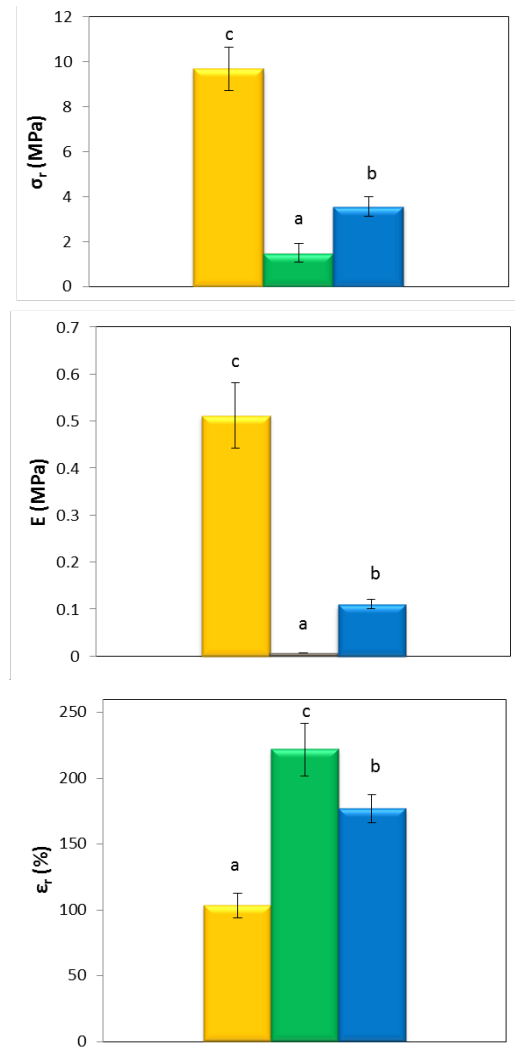


Figura III.2.7. Tensión a la rotura (σ_r), módulo de Young (E) y elongación a la rotura (ϵ_r) de las películas obtenidas a pH 6: ■ G+ NM, ■ G+ (NM+VBC) y ■ G+ VBC.

III.2.3.4 Capacidad de respuesta a cambios de pH de películas G + (NM+VBC)

En la Figura III.2.8 se observan los cambios de coloración de las películas G+(NM+VBC) al estar enfrentadas a distintos medios: líquidos, gaseosos y semisólidos, ácidos y alcalinos. Las películas G+(NM+VBC) modificaron su coloración frente a los medios líquidos, gaseosos y semisólidos. Frente a los medios ácidos las películas proteicas cambiaron su coloración de verde a amarillo y frente a medios alcalinos la coloración se modificó a color violeta en los tres medios evaluados (Figura III.2.8). En todos los casos, los cambios de coloración resultaron reversibles. Además los cambios de coloración fueron notorios y fáciles de distinguir a simple vista por el potencial consumidor, por lo que se evaluó la posibilidad de enfrentar estas películas a un sistema cárnico real.

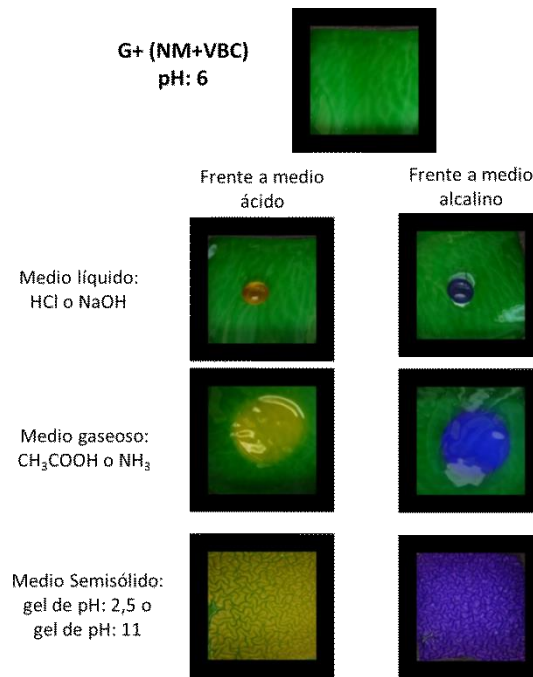


Figura III.2.8. Respuesta de las películas de gelatina con mezcla de indicadores ácido-base, G+(NM+VBC) (obtenidas a pH 6) frente a medios líquidos, gaseosos y semisólidos, con distintos pHs: ácidos y alcalinos.

III.2.3.5 Evaluación de las películas aditivadas con la mezcla de colorantes (NM+VBC) como envase inteligente para carne de pescado

Se evaluó la respuesta de la película G+(NM+VBC) durante el almacenamiento refrigerado de carne de pescado, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente. En las fotografías de la Figura III.2.9 se observa el ensayo con las películas en contacto directo con la carne de pescado y con el espacio de cabeza del envase. Se puede observar que entre el día 1 y el día 2 la coloración de las películas se modifica de verde a verde-azulado. Estos resultados coinciden con el tiempo en que la carne de pescado modifica su valor de pH debido al crecimiento microbiano, en este caso modificando su valor de 6,2 (día 1) a 7,6 (día 2).

Sin embargo, la dificultad que se presentó fue que la mezcla de indicadores ácido-base no se retuvo en la matriz proteica, si no que difundió hacia la carne de pescado. Más allá de la naturaleza no comestible del indicador, este comportamiento no es deseado ya que modificó la coloración del alimento prácticamente desde el inicio del ensayo. Se intentó retener la mezcla de indicadores ácido-base en la matriz proteica mediante el agregado de distintos nanorefuerzos, como nanofibras de celulosa o montmorillonita, pero no se logró

el fin buscado (datos no mostrados).

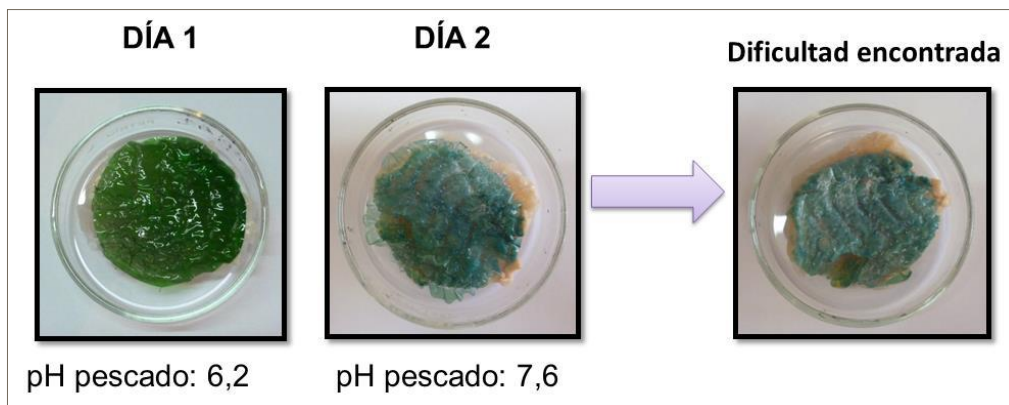


Figura III.2.9. Respuesta de las películas colocadas en contacto directo con la carne de pescado y el espacio de cabeza del envase durante el almacenamiento refrigerado los días 1 y 2.

Por otro lado, en la Tabla III.2.4 se muestran los parámetros de color obtenidos de la película G+(NM+VBC) colocada en contacto directo sólo con el espacio de cabeza del envase durante los días 1 y 2 de almacenamiento refrigerado. Los parámetros de color de la película muestran que sus valores de luminosidad de la película aumentan con el deterioro del pescado (Tabla III.2.4). El valor de a^* también aumenta alejándose de la coloración verdosa característica para estos valores (de -28,4 a -6,7) y los valores de b^* luego del día de ensayo cambian de valores positivos a negativos coincidente con la tonalidad azul en el día 2.

Tabla III.2.4 Parámetros de color de las películas en contacto directo sólo con el espacio de cabeza del envase durante los días 1 y 2 de almacenamiento refrigerado de carne de pescado.

| Parámetros de Color de G + (NM+VBC) | L* | a* | b* | ΔE^* |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Día 1 | 69,7 ±0,9 ^a | -28,4±1,3 ^a | 15,4±2,0 ^b | 41,3±2,0 ^b |
| Día 2 | 80,5±1,8 ^b | -6,7±0,6 ^b | -6,9±0,5 ^a | 19,1±2,2 ^a |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

En la Figura III.2.10. se muestran los resultados del ensayo realizado con la película G+(NM+VBC) en contacto directo con el espacio de cabeza del envase. Los resultados fueron positivos ya que se modificó la coloración de la película durante los días 1 y 2 de almacenamiento refrigerado. El cambio de coloración de verde a azulado pone en

evidencia el deterioro de la carne de pescado, por un aumento del pH en el espacio de cabeza del envase. Cabe destacar que debajo de las películas proteicas se colocó un fondo blanco (papel) para apreciar el cambio de coloración.

La concentración de los compuestos volátiles correspondientes a distintas aminas que ocasionan el deterioro de la carne de pescado es la responsable del cambio de pH evaluado. Esta aplicación podría utilizarse para alertar al consumidor de una manera fácil y rápida sobre el deterioro de la carne de pescado envasada e indicarle si se encuentra apta o no para su consumo.

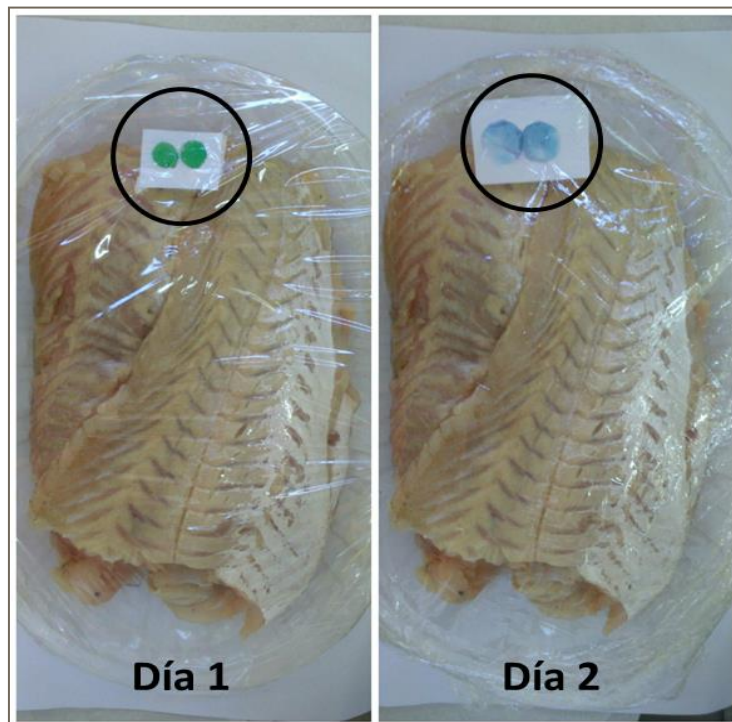


Figura III.2.10. Respuesta de las películas con mezcla de indicadores ácido-base G+(NM+VBC) frente al deterioro de carne de pescado en el espacio de cabeza del envase durante los días 1 y 2 de almacenamiento refrigerado a 4°C.

III.2.4 Conclusiones

Se lograron obtener películas de gelatina aditivadas con distintas mezclas de indicadores ácido-base sintéticos, capaces de modificar su coloración como respuesta al cambio de pH del medio. La utilización de mezclas de colorantes permitió modificar el rango de viraje de los indicadores. La película de gelatina aditivada con mezcla NM+VBC (50:50) a pH 6 presentó las características apropiadas para ser utilizada como indicador de deterioro de pescado, ya que modificaba su coloración en el valor de pH correspondiente a un

III.2. Películas proteicas capaces de indicar deterioro microbiano en carnes a través de su respuesta frente a cambios de pH.

crecimiento microbiano límite a partir del cual el pescado deja de ser apto para consumo. Estas películas lograron actuar como indicadores de deterioro microbiano al aplicarlas directamente sobre pescado y al ponerlas en contacto con el espacio de cabeza del envase. La difusión del colorante sobre el músculo por contacto directo invalidaría esta forma de aplicación. Los materiales desarrollados podrían ser usados ya sea como material de embalaje o etiqueta para ser aplicado en contacto con el espacio de cabeza como indicador de deterioro de pescado durante su almacenamiento refrigerado.

III.3. Películas proteicas aditivadas con curcumina

III.3.1. Introducción

La curcumina, de origen asiático, es un producto obtenido de la cúrcuma -rizomas de *Cúrcuma longa*- por extracción con solventes y posterior purificación por cristalización (Figura II.3.1). En la actualidad todos los países tropicales la cultivan, pero los principales exportadores son India, China, Sri Lanka, Filipinas. La palabra cúrcuma viene del árabe kourkoum (azafrán), ya que se creía que la cúrcuma era una variedad del azafrán. Su sabor es dulce, con tonos amargo y picante. Del rizoma también puede extraerse aceites esenciales con propiedades medicinales (Barclay y col., 2000).



Figura III.3.1. Imagen del rizoma de la cúrcuma y su extracto seco.

En el código alimentario argentino (CAA) la curcumina se presenta dentro de los condimentos vegetales con el nombre E-100i (Capítulo XVI: correctivos y coadyuvantes, artículo 1230). Es ampliamente utilizada como especia y como colorante en los alimentos por su aroma agradable y color naranja-amarillento (Martins y col., 2016). Se utiliza para tal fin en mantecas, quesos, diversas conservas, mostazas, cereales, sopas, caldos, productos cárnicos y lácteos. También se ha utilizado en una variedad de aplicaciones farmacéuticas, ya que se ha probado que exhibe actividades antiinflamatoria, antimutagénica, antimicrobiana y antioxidante; logrando prevenir enfermedades como diabetes, alergias, artritis, Alzheimer y otras enfermedades crónicas, distintos tipos de cáncer, el crecimiento microbiano y la formación de radicales libres (Pulido-Moran y col., 2016). Su nombre por IUPAC es (1E, 6E)-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona. En solución, presenta tautomerismo ceto-enol y, dependiendo del solvente, hasta un 95% podría estar en forma enol. En la Figura III.3.2 se muestran las estructuras químicas ceto y enólica de la curcumina. En el rango de pH de 1 a 7, la mayoría

de estos compuestos están en la forma neutra. Al tratarse de un compuesto orgánico, su solubilidad en agua es muy baja y sus soluciones son de color amarillo. A $\text{pH} > 8,5$, las soluciones cambian su color a rojo y su solubilidad en agua apenas aumenta. Sin embargo, debido a su estructura química, la curcumina es altamente soluble en etanol, cloroformo, sulfóxido de dimetilo y diferentes aceites (Mehanny y col., 2016; Priyadarsini, 2014).

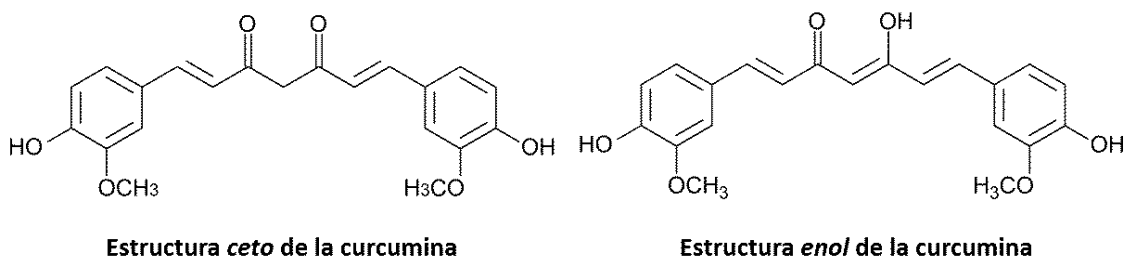


Figura III.3.2. Estructuras químicas de la curcumina en tautomerismo ceto-enol.

En algunos trabajos se utilizó a la curcumina para activar películas en base a polímeros naturales y sintéticos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Bajpai y col., 2015; Govindaraj y col., 2014; Liu y col., 2016; Mayet y col., 2014). Por su parte Maniglia y col., (2014 y 2015) utilizaron los residuos de la extracción de colorantes de la cúrcuma para la producción de películas bioactivas. Algunos pocos autores han usado la curcumina para desarrollar indicadores de pH para la detección de aminas volátiles. Kuswandi y col., (2012) desarrollaron un método de absorción de la curcumina sobre una membrana de celulosa bacteriana y lo utilizaron como un indicador adhesivo útil para el monitoreo en tiempo real del deterioro de camarones, ya que esta membrana era altamente sensible a las reacciones ácido-base. Por otra parte, Ma y col. (2017) estudiaron la capacidad de sensar amoníaco en películas con goma tara, polivinilalcohol y curcumina.

El **objetivo** de este trabajo fue desarrollar películas de gelatina capaces de detectar cambios de pH del medio por agregado de curcumina a las dispersiones filmogénicas y evaluar la posible activación de los materiales resultantes con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Teniendo en cuenta la hidrofobicidad de la curcumina se utilizaron dos solventes, agua y una mezcla etanol-agua para preparar las dispersiones filmogénicas.

III.3.2 Materiales y métodos

III.3.2.1 Materiales

Se continuó trabajando con gelatina bovina con un valor de Bloom de 240 (Royal, Kraft Foods, Argentina) como fuente de proteína y glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante de las películas. Se utilizó curcumina (Chr Hansen, Argentina) como aditivo. Todos los demás reactivos utilizados en este capítulo fueron de calidad analítica.

III.3.2.2 Formación de las películas

Las películas se prepararon por *casting* utilizando agua y una mezcla de etanol y agua (1: 1 v / v) como solventes. En cada caso, se prepararon dos dispersiones separadas: una conteniendo 10% p/v de gelatina en agua a 100 ° C y otra conteniendo 0,04% p/v de curcumina en agua o etanol, respectivamente, a temperatura ambiente. Volúmenes iguales de las dispersiones de proteínas y de curcumina se mezclaron con agitación magnética, agregando glicerol (1,25% p/v) como plastificante. El pH de cada dispersión se ajustó a 6 y 11 con HCl 2 M y NaOH 2 M, respectivamente. Finalmente, se vertieron 10 ml de cada dispersión filmogénica sobre placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en una estufa de convección forzada (Yamato, DKN600, EE.UU.) a 60 ° C durante 3 h. Las películas resultantes se acondicionaron durante 48 h a 20 ° C y 58% de humedad relativa (en desecadores con soluciones saturadas de NaBr) antes de ser removidas de las placas para su caracterización. Además, como control se obtuvieron películas de gelatina en ambos disolventes a pH = 6 y 11, como se describió anteriormente, pero sin la incorporación de curcumina. La Tabla II.3.1 sintetiza la nomenclatura de las películas y la formulación de las dispersiones filmogénicas.

Tabla III.3.1. Nomenclatura de las películas y la formulación final de las dispersiones filmogénicas.

| Nomenclatura de las películas | Formulación final de las dispersiones filmogénicas | | | | |
|-------------------------------------|--|---------------------|----------------------|----|-------------|
| | Gelatina (% p/v) | Glicerol (% p/v) | Curcumina (% p/v) | pH | Solvente |
| G-a6 | 5 | 1,25 | - | 6 | Agua |
| G-a11 | 5 | 1,25 | - | 11 | Agua |
| G+C-a6 | 5 | 1,25 | 0,02 | 6 | Agua |
| G+C-a11 | 5 | 1,25 | 0,02 | 11 | Agua |
| G-ea6 | 5 | 1,25 | - | 6 | Etanol-Agua |
| G-ea11 | 5 | 1,25 | - | 11 | Etanol-Agua |
| G+C-ea6 | 5 | 1,25 | 0,02 | 6 | Etanol-Agua |
| G+C-ea11 | 5 | 1,25 | 0,02 | 11 | Etanol-Agua |

III.3.2.3 Caracterización de las películas

Las películas fueron caracterizadas según su espesor, color, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas en tracción tal cual se describió en la sección III.1.2.3. Además se analizó la capacidad antioxidante de las películas por los métodos ABTS^{•+} y FRAP y su capacidad antimicrobiana por ensayos de difusión en discos de agar, según se describe a continuación.

III.3.2.3.1 Propiedades antioxidantes

Los sobrenadantes obtenidos en el ensayo de solubilidad en agua (sección III.1.2.3.6) se utilizaron para estudiar la capacidad antioxidante de las películas basándose en dos mecanismos antioxidantes diferentes:

- **Método ABTS (capacidad de secuestrar radicales catiónicos):** Se empleó el ensayo de decoloración de cationes de radicales de ABTS^{•+}. Una solución stock del radical ABTS^{•+} fue obtenida por reacción del ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))

(7 mM, Sigma-Aldrich) con persulfato de potasio (2,45 mM, Sigma)) incubados en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h, según la técnica utilizada por Salgado y col. (2012). Previo al ensayo, una alícuota de la solución stock del radical ABTS^{•+} fue diluida con agua destilada hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Las muestras se mezclaron con el reactivo ABTS^{•+} y se dejaron reposar a 30 ° C durante 10 min. Se leyeron los valores de absorbancia a 734 nm en un lector de placas (Biotek, modelo Synergy HT, USA). Los resultados se expresaron como la concentración equivalente de ácido ascórbico por gramo de película, empleando una curva de calibración que relaciona la concentración de ácido ascórbico con la absorbancia a 734 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

- **Método FRAP (poder reductor del hierro):** La capacidad reductora se evaluó por el método FRAP, según Salgado y col. (2012). El método está basado en el incremento de la absorbancia a 595 nm debido a la formación de un complejo entre la 2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ,) y el Fe^{+2} en presencia de agentes reductores a 37 °C. Las muestras se incubaron a 37 °C con agua destilada y reactivo FRAP (que contenía 2, 4,6-tripiridil-s-triazina y $FeCl_3 \cdot 7H_2O$) en un *buffer* de acetato sódico a pH 3,6. Los valores de absorbancia se leyeron a 595 nm después de 30 min (Biotek, Synergy HT, USA). Como blanco de reactivos se realizó el mismo procedimiento con agua destilada. Simultáneamente se realizó una curva de calibración que relaciona la concentración de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ con la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como concentración de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (μM) por cada gramo de película proteica. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

III.3.2.3.2 Propiedades antimicrobianas

Se determinó la actividad antimicrobiana de las películas de gelatina por el método de difusión en agar contra *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia Coli*, *Bacillus Cereus* y *Staphylococcus Aureus* (Salgado y col., 2013). Las cepas, se seleccionaron por su importancia en la salud o por ser responsables del deterioro de alimentos. Se cortaron en esterilidad discos de 10 mm de diámetro de las películas de gelatina. Estos se colocaron en placas conteniendo agar nutritivo (Biokar Diagnostics) inoculadas previamente con 100 μl de inóculo bacteriano con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonia por ml de cada bacteria ensayada. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Luego se

examinaron visualmente para verificar la "zona de inhibición" considerada como la actividad antimicrobiana de las películas y se determinó el diámetro de la zona con un calibre. Las pruebas se realizaron por duplicado.

III.3.2.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$ utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statgraphics, EE.UU.).

III.3.3 Resultados y discusión

III.3.3.1 Aspecto y propiedades ópticas de las películas

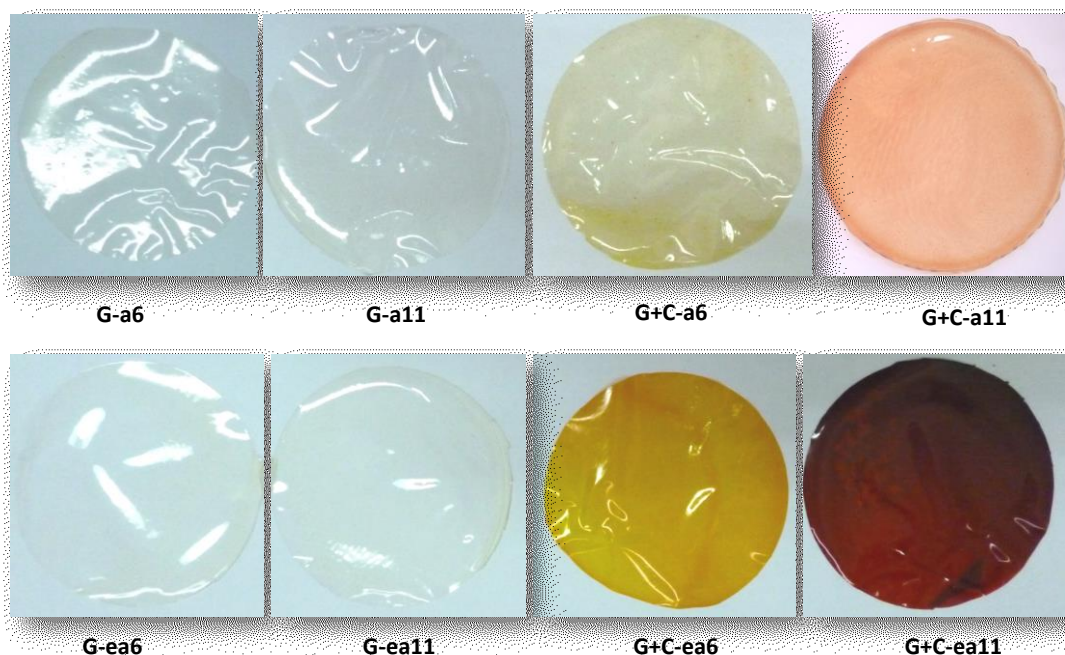


Figura III.3.3. Fotografía de las películas obtenidas con y sin curcumina en distintos solventes: agua y mezcla etanol-agua pHs 6 y 11.

Las películas de gelatina formuladas con o sin curcumina a partir de dispersiones acuosas o hidroalcohólicas a pH 6 u 11 resultaron homogéneas, delgadas y flexibles. La Figura III.3.3 muestra su apariencia visual. Las películas de gelatina sin agregado de curcumina

resultaron incoloras independientemente del pH y del solvente utilizado. El agregado de curcumina coloreó las películas de amarillo a pH 6 y de naranja-rojizo a pH 11. Pero cabe resaltar que esta coloración se volvió significativamente más intensa en las películas preparadas usando la mezcla etanol-agua como disolvente.

Los parámetros de color L^* , a^* , b^* y ΔE^* de las películas estudiadas se muestran en la Tabla III.3.2. Las películas de gelatina a diferentes pH no mostraron diferencias significativas en los parámetros de color, con excepción de las preparadas con mezclas etanol-agua que presentaron un mayor valor de L^* , y las de pH 6 que mostraron un pequeño aumento en el parámetro b^* . Los cambios de coloración observados con el agregado de curcumina se registraron al medir los parámetros de color a través de un aumento significativo ($p < 0,05$) de los valores a^* , b^* y ΔE^* y una disminución significativa ($p < 0,05$) de L^* siendo estas tendencias más marcadas en las películas preparadas usando mezclas etanol-agua como solvente. Como es de esperar, las películas que tomaron coloración amarilla presentaron mayores valores de b^* y las que tomaron coloración rojiza mayores valores de a^* .

Tabla III.3.2. Parámetros de color de las películas obtenidas con y sin curcumina en distintos solventes: agua y mezcla etanol-agua a pHs 6 y 11.

| Película | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
|-----------------|---------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Ga6 | $93,3 \pm 0,5^e$ | $-0,94 \pm 0,07^a$ | $2,7 \pm 0,6^a$ | $1,8 \pm 0,5^a$ |
| G-a11 | $93,9 \pm 0,6^{ef}$ | $-1,07 \pm 0,07^a$ | $2,0 \pm 0,1^a$ | $2,6 \pm 0,2^a$ |
| G+C-a6 | $89,1 \pm 0,4^d$ | $-2,40 \pm 0,20^a$ | $39,3 \pm 1,7^d$ | $38,3 \pm 1,7^c$ |
| G+C-a11 | $83,1 \pm 3,3^c$ | $7,70 \pm 0,20^b$ | $25,1 \pm 0,9^c$ | $27,9 \pm 0,8^b$ |
| G-ea6 | $96,2 \pm 0,7^{ef}$ | $-0,70 \pm 0,10^a$ | $5,4 \pm 0,3^a$ | $3,5 \pm 0,7^a$ |
| G-ea11 | $97,3 \pm 0,3^f$ | $-0,40 \pm 0,01^a$ | $2,4 \pm 0,5^a$ | $3,4 \pm 0,3^a$ |
| G+C-ea6 | $72,6 \pm 3,4^b$ | $21,3 \pm 3,00^c$ | $86,4 \pm 6,0^e$ | $90,5 \pm 4,5^e$ |
| G+C-ea11 | $28,0 \pm 2,2^a$ | $35,8 \pm 3,70^d$ | $19,1 \pm 1,9^b$ | $80,3 \pm 6,1^d$ |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c, d, e y f) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

La coloración más intensa observada en las películas obtenidas con la mezcla hidroalcohólica puede deberse a la mayor solubilidad de la curcumina en este medio debido a su naturaleza hidrofóbica (Priyadarsini, 2014).

En la Figura III.3.4 se muestra la apariencia de las dispersiones de curcumina en ambos solventes. El desarrollo del color en estos sistemas podría implicar que el agua puede dispersar a la curcumina (panel A), mientras que la mezcla hidroalcohólica parece disolverla completamente (panel B). La adición de gelatina y glicerol en los sistemas (Figura III.3.4 C y D) aparentemente mejora la dispersión del colorante e incluso modifica su tonalidad, especialmente en las dispersiones acuosas.

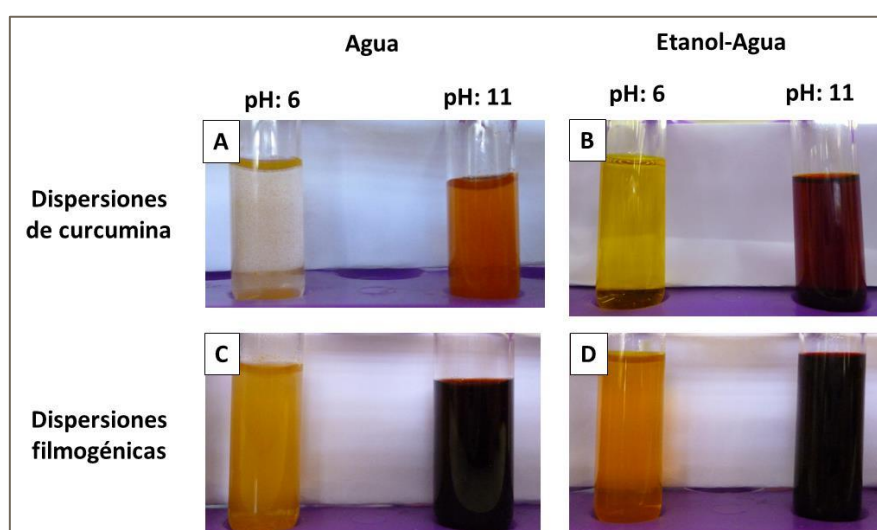


Figura III.3.4. Dispersiones de curcumina en distintos solventes: (A) agua y (B) mezcla etanol-agua y dispersiones filmogénicas con agregado de curcumina en distintos solventes (C) agua y (B) mezcla etanol-agua a pHs 6 y 11.

La Figura III.3.5 muestra los espectros de absorción UV-visible de las películas estudiadas. Las películas de gelatina (G-a6, G-a11, G-ea6 y G-ea11) mostraron el mismo espectro independientemente del pH y del solvente utilizado en las dispersiones filmogénicas. Estos espectros presentaron dos picos de absorción a 205 y 230 nm atribuidos a enlaces peptídicos, otro a 260-280 nm correspondiente a aminoácidos aromáticos y una absorbancia mínima en el rango completo del espectro visible. Priyadarsini (2014) informó que el espectro de absorción de la curcumina presenta dos picos de absorción bien marcados, uno en la región UV con un máximo a 265 nm y otro en la región visible con un rango máximo que puede ir de 410 hasta 430 nm. La adición de curcumina en las películas

de gelatina aumentó los picos de absorción en la región UV, especialmente los de 260-265 nm. Las películas con agregado de curcumina obtenidas a pH 11 (G+C-a11 y G+C-ea11) mostraron dos nuevos picos de absorción en la región UV con máximos a 345 nm y 395 nm, lo que podría atribuirse a productos de degradación de la curcumina en condiciones alcalinas, como aldehído ferúlico, ácido ferúlico y vainillina (Wang y col., 1997). Además, en el intervalo del espectro visible, las películas G+C-a6 y G+C-ea6 presentaron un pico de absorción a 420 nm, mientras que G+C-a11 y G+C-ea11 mostraban un pico a 460 nm conforme su coloración rojiza.

Estos resultados también coinciden con los de Priyadarsini (2014), quien obtuvo valores de picos de absorción de curcumina a 420 nm a pH <7,5 y a 467 nm a pH > 10. Cabe destacar que las películas formuladas con gelatina y curcumina preparadas a partir de dispersiones hidroalcohólicas (G+C-ea6 y G+C-ea11) presentaron una mayor absorbancia en todo el intervalo UV visible que las preparadas a partir de dispersiones acuosas al mismo pH (G+C-a6 y G+C-a11) debido a la mejor solubilización de curcumina.

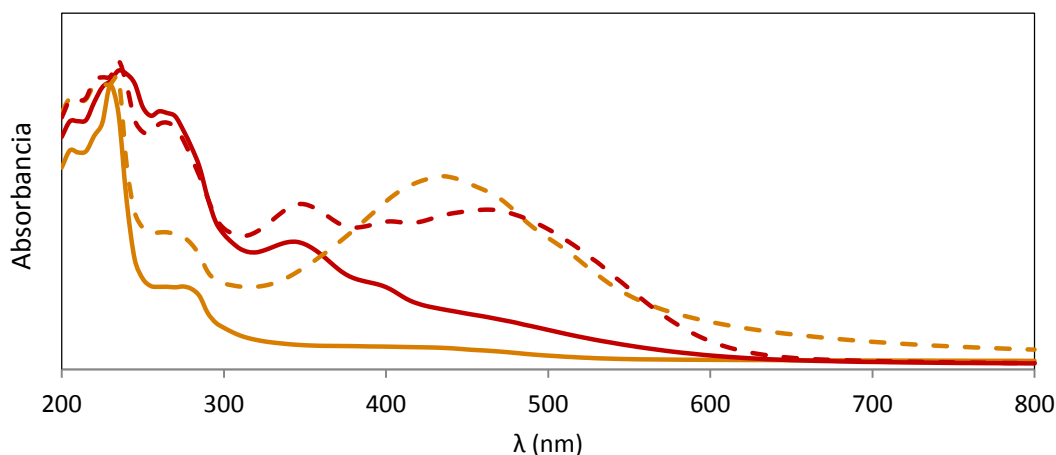


Figura III.3.5. Espectros de absorción UV-Vis de las películas con y sin agregado de curcumina en distintos solventes (agua y mezcla etanol-agua): — G+Ca6, — G+C-a11, - - G+C-ea6, - - G+C-ea11.

III.3.3.2 Respuesta de las películas a cambios de pH del medio

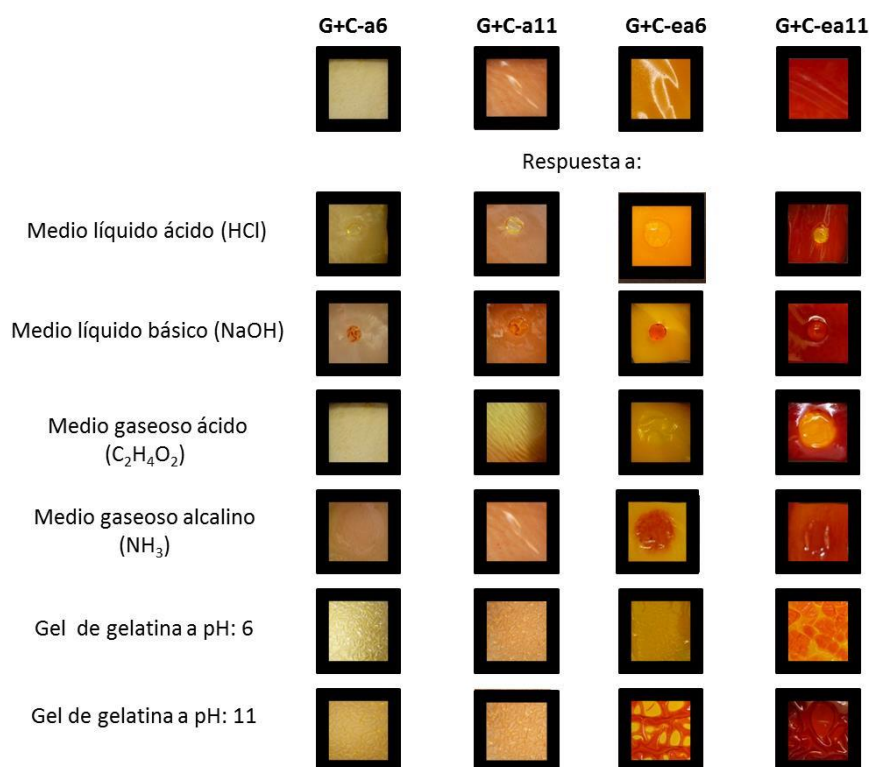


Figura III.3.6. Respuesta de las películas de gelatina con agregado de curcumina en distintos solventes (agua y mezcla etanol-agua) G+C-a6, G+C-a11, G+C-ea6 y G+C-ea11, frente a medios líquidos, gaseosos y semisólidos a distintos pHs ácidos y alcalinos.

La Figura III.3.6 muestra la respuesta de las películas de gelatina aditivadas con curcumina a pH 6 y 11, preparadas usando agua y la mezcla etanol-agua como solvente (G+C-a6, G+C-a11, G+C-ea6 y G+C-ea11) cuando están en contacto con medios líquidos, gaseosos o semisólidos ácidos o alcalinos. La curcumina presente en la formulación le otorga a las películas la capacidad de indicar cambios de pH del medio a través del cambio de la coloración del material. Las películas amarillas obtenidas a pH 6 (G+C-a6 y G+C-ea6) tomaron color naranja-rojizo cuando se enfrentaron a medios alcalinos, mientras que las rojizas obtenidas a pH 11 (G+C-a11 y G+C-ea11) viraron al amarillo en contacto con medios ácidos. Los cambios fueron más notorios con las películas obtenidas a partir de dispersiones hidroalcohólicas debido a su coloración más intensa. Como era de esperar, el color de las películas permaneció intacto al someterlas al contacto con medios cuyo pH era cercano al de la formulación. Las respuestas de las películas fueron inmediatas y notables con los medios líquidos y gaseosos de diferente pH, pero menos evidentes y más lentas

con medios semisólidos, especialmente en las películas preparadas a partir de dispersiones acuosas. Esta cinética de viraje más lenta probablemente podría atribuirse a procesos difusivos limitados tal como se mencionó en la sección III.1.3.2. Kuswandi y col. (2012) informaron el cambio de color de amarillo a naranja, y luego a naranja rojizo como indicador de deterioro de camarones al medir el aumento de pH producido por aminas básicas volátiles liberadas gradualmente en el espacio de cabeza del envase.

III.3.3.3 Efecto del pH, el solvente y la adición de curcumina en las propiedades fisicoquímicas de las películas

La Tabla III.3.3 muestra el espesor, el contenido de humedad, la solubilidad en agua y la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas. Las películas de gelatina formuladas a partir de dispersiones acuosas resultaron más delgadas que las formuladas con la mezcla etanol-agua como disolvente ($p < 0,05$). El etanol puede desnaturalizar las proteínas interrumpiendo los enlaces puente de hidrógeno intramoleculares formados por sus cadenas laterales y permitiendo la formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre moléculas de alcohol y las cadenas laterales de proteínas.

Salgado y col., (2016) mostraron cómo la conformación inicial de las proteínas en las dispersiones filmogénicas afecta las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes. Es evidente que la gelatina dispersa en mezclas etanol-agua produjo películas con un menor grado de compactación, lo que sugiere un despliegue de las cadenas diferente o un entrecruzamiento en la matriz proteica (Denavi y col., 2009). Estas películas mostraron menor contenido de humedad y WVP ($p < 0,05$) y una solubilidad en agua similar ($p > 0,05$) que las preparadas a partir de dispersiones acuosas, independientemente del pH de la dispersión filmogénica. La adición de curcumina aumentó significativamente ($p < 0,05$) los valores de espesor de las películas preparadas a pH 11 en agua mientras que disminuyeron ($p < 0,05$) los de las películas preparadas a pH 6 empleando la mezcla etanol-agua como solvente. El agregado de curcumina también causó una disminución en el contenido de agua y WVP de las películas formuladas a partir de dispersiones acuosas ($p < 0,05$) y sólo un aumento en el contenido de agua de las formuladas a partir de dispersiones hidroalcohólicas ($p < 0,05$). Pareciera que tanto el etanol como la curcumina aumentaron el carácter hidrófobo de las películas de gelatina, sin afectar su solubilidad en agua ($p > 0,05$). En todos los casos, el pH de las dispersiones filmogénicas (tanto acuosas

como hidroalcohólicas) no modificaron ($p > 0,05$) el contenido de humedad y la solubilidad en agua de las películas de gelatina estudiadas con o sin curcumina.

Tabla III.3.3. Espesor, contenido de agua (MC), solubilidad en agua (S) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas obtenidas con y sin curcumina en distintos solventes: agua y mezcla etanol-agua a pHs 6 y 11: G-a6, G-a11, G+C-a6, G+C-a11, G-ea6, G-ea11, G+C-ea6, G+C-ea11.

| Película | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP. 10^{10} ($\text{g H}_2\text{O}/\text{Pa.s.m}$) |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|
| G-a6 | $51,0 \pm 2,3$ ^{ab} | $22,1 \pm 0,6$ ^e | $37,6 \pm 2,7$ ^a | $6,5 \pm 0,3$ ^b |
| G-a11 | $47,8 \pm 3,4$ ^a | $21,4 \pm 0,2$ ^{de} | $34,6 \pm 1,8$ ^a | $7,9 \pm 0,4$ ^c |
| G+C-a6 | $49,6 \pm 5,2$ ^{ab} | $18,9 \pm 0,5$ ^{bc} | $30,3 \pm 4,7$ ^a | $1,0 \pm 0,01$ ^a |
| G+C-a11 | $55,8 \pm 3,5$ ^{bc} | $20,2 \pm 0,3$ ^{cd} | $33,8 \pm 4,3$ ^a | $0,9 \pm 0,03$ ^a |
| G-ea6 | $62,4 \pm 3,5$ ^d | $16,9 \pm 0,7$ ^a | $36,8 \pm 0,6$ ^a | $1,1 \pm 0,3$ ^a |
| G-ea11 | $61,4 \pm 1,9$ ^{cd} | $16,6 \pm 0,3$ ^a | $35,7 \pm 3,4$ ^a | $1,2 \pm 0,3$ ^a |
| G+C-ea6 | $63,7 \pm 6,2$ ^d | $17,0 \pm 1,1$ ^a | $34,5 \pm 5,1$ ^a | $1,1 \pm 0,3$ ^a |
| G+C-ea11 | $64,3 \pm 6,0$ ^d | $17,8 \pm 1,0$ ^{ab} | $34,9 \pm 3,1$ ^a | $1,2 \pm 0,2$ ^a |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c, d) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Sólo el espesor y WVP fueron modificados por cambios en el pH en las películas G+C-a11 que resultaron más gruesas que G+C-a6 ($p < 0,05$) y G-a11 mostró valores mayores de WVP que Ga6 ($p < 0,05$).

La Tabla III.3.4 muestra las propiedades mecánicas de las películas, medidas en ensayos de tracción. Las películas de gelatina obtenidas a partir de dispersiones acuosas mostraron propiedades mecánicas similares a las informadas por otros autores (Carvalho y col., 2008; Nur y col., 2012;). Particularmente aquellas obtenidas a pH 11 presentaron mayor resistencia a la tracción y elongación a la rotura ($p < 0,05$) pero similar módulo de *Young* que las películas obtenidas a pH 6, en concordancia con resultados previos observados en la sección III.1.3.3. Con la adición de curcumina así como también con la sustitución del solvente acuoso por una mezcla hidroalcohólica, las películas presentaron una disminución significativa en el módulo de *Young* (de al menos 50%) ($p < 0,05$). El agregado de curcumina

también disminuyó los valores de tensión a la rotura de las películas obtenidas en medio alcalino en los dos solventes estudiados, pero en el caso de la elongación a la rotura, sólo el de las películas a pH 11 ($p < 0,05$). Además, la adición de etanol como solvente disminuyó la tensión a la rotura de todas las películas, excepto aquellas con curcumina a pH 11.

Tabla III.3.4. Tensión a la rotura (σ_r), Elongación a la rotura (ϵ_r) y módulo de *Young* (E) de las películas obtenidas con y sin curcumina en distintos solventes: agua y mezcla etanol-agua a pHs 6 y 11: G-a6, G-a11, G+C-a6, G+C-a11, G-ea6, G-ea11, G+C-ea6, G+C-ea11.

| Película | σ_r (MPa) | ϵ_r (%) | E (MPa) |
|-----------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| G-a6 | 3,4 ± 0,3 ^c | 159,2 ± 5,5 ^{ab} | 0,15 ± 0,07 ^e |
| G-a11 | 4,6 ± 0,1 ^d | 206,9 ± 6,0 ^c | 0,13 ± 0,09 ^{de} |
| G+C-a6 | 3,4 ± 0,6 ^c | 157,4 ± 11,4 ^a | 0,06 ± 0,005 ^{bc} |
| G+C-a11 | 1,9 ± 0,5 ^a | 176,5 ± 20,0 ^b | 0,008 ± 0,001 ^a |
| G-ea6 | 2,6 ± 0,2 ^b | 163,3 ± 13,1 ^{ab} | 0,06 ± 0,01 ^{bc} |
| G-ea11 | 1,7 ± 0,3 ^a | 175,5 ± 17,9 ^b | 0,01 ± 0,001 ^{ab} |
| G+C-ea6 | 1,7 ± 0,4 ^a | 146,3 ± 7,9 ^a | 0,03 ± 0,01 ^{abc} |
| G+C-ea11 | 5,5 ± 0,4 ^e | 213,9 ± 20,1 ^c | 0,08 ± 0,01 ^{cd} |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c, d, e) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Sin embargo, parece que los dos efectos principales, la presencia de curcumina y el uso de la mezcla etanol-agua como solvente, afectan el entrecruzamiento de las películas de gelatina, aunque no se observó diferencia en su solubilidad en agua. Es evidente que cuando aumenta la hidrofobicidad de la matriz proteica, debido a modificaciones en su estructura causadas por el cambio de solventes, o mediante la adición de un componente más hidrófobo como la curcumina, hay cambios en el entrecruzamiento de las proteínas, dando como resultado una disminución en el módulo de *Young*. Aunque este cambio no afectaría significativamente la elongación de la matriz ni su solubilidad en agua. La composición aminoacídica de la gelatina, -con pocos grupos sulfidrilos- podría explicar este comportamiento. En otras matrices proteicas como las de soja, girasol, amaranto y gluten,

la solubilidad y las propiedades mecánicas son determinadas por la posibilidad del entrecruzamiento a través de enlaces disulfuro (Condés y col., 2015., Mauri y Añón, 2006 y Salgado y col., 2011).

III.3.3.4 Propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las películas

La Figura III.3.7 muestra las propiedades antioxidantes de las películas de gelatina estudiadas evaluadas por diferentes métodos: ABTS^{*+} (paneles A y C) y FRAP (paneles B y D). Las películas de gelatina sin adición de curcumina mostraron una baja capacidad antioxidante en ambos métodos, especialmente a pH 6. Estos resultados podrían atribuirse en parte a algunos aminoácidos de gelatina que pueden actuar como donadores de electrones, reaccionando con los radicales libres para dar lugar a productos más estables en los ensayos de ABTS o en la reducción del ión férrico en el ensayo FRAP (Salgado y col., 2012). La adición de curcumina a las formulaciones aumentó significativamente las propiedades antioxidantes de las películas resultantes ($p < 0,05$), siendo estos incrementos más notables a pH alcalino que a pH 6 ($p < 0,05$). Por otra parte, las películas de gelatina con o sin curcumina, formuladas a partir de dispersiones hidroalcohólicas, mostraron propiedades antioxidantes superiores a las formuladas usando agua como solvente ($p < 0,05$). Las diferencias en el entrecruzamiento de las proteínas, así como los cambios en la naturaleza hidrofílica-hidrofóbica de la matriz proteica, podrían estar modificando la retención o liberación de principios activos tanto de gelatina como de curcumina, afectando las propiedades antioxidantes de las películas resultantes. A medida que la estructura química de la curcumina cambia con el pH de las dispersiones filmogénicas, podría interactuar diferencialmente con la gelatina, resultando en películas con diferentes propiedades antioxidantes. Estos resultados sugieren que se podrían utilizar las películas de gelatina aditivadas con curcumina, especialmente aquellas obtenidas usando mezclas etanol-agua como disolvente a pH alcalino, como películas activas con una importante actividad antioxidante.

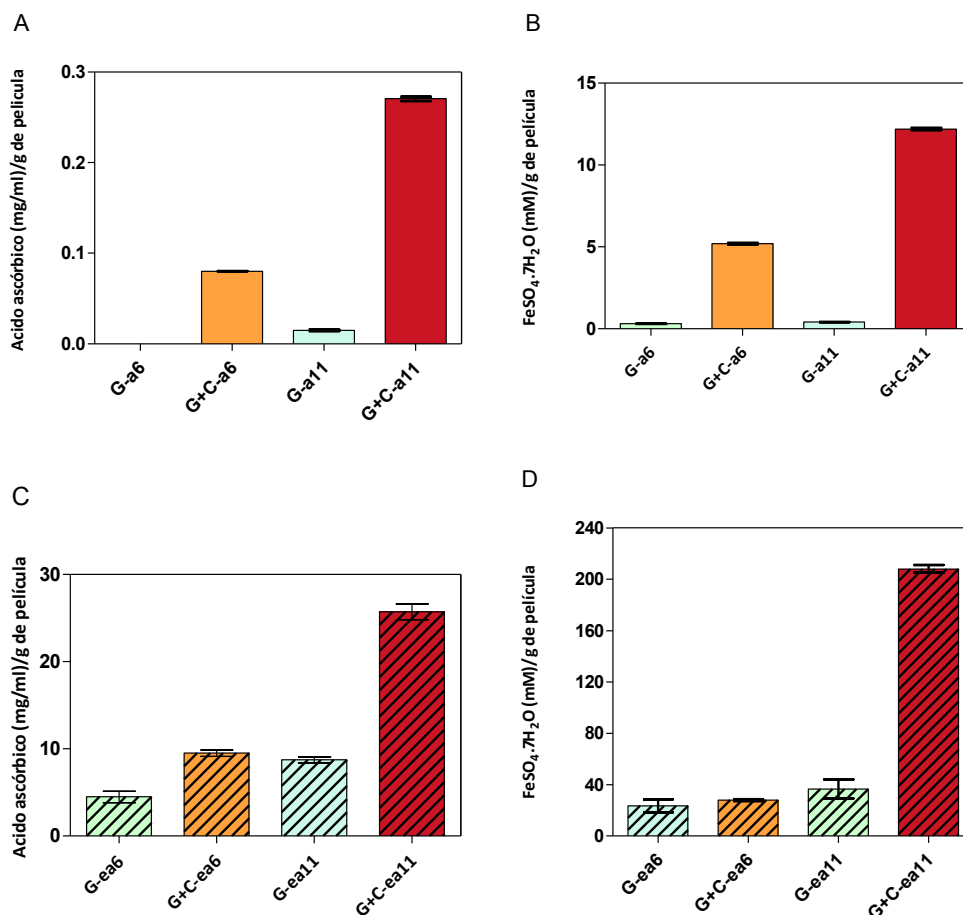


Figura III.3.7. Propiedades antioxidantes (medidas mediante ensayos ABTS y FRAP) de películas a base de gelatina (G) y de curcumina (G+C) obtenidas con diferentes solventes: agua (a), paneles **A** y **B**, y mezcla etanol-agua (ea), paneles **C** y **D**. Los paneles **A** y **C** corresponde a ABTS y los paneles **B** y **D** a FRAP.

A pesar de la actividad antimicrobiana de la curcumina frente a distintas cepas de hongos, bacterias y virus informados en la bibliografía (Ferreira y col., 2013, Liu y col., 2016, Moghadamtousi y col., 2014) las películas de gelatina y curcumina desarrolladas en esta tesis no mostraron actividad antimicrobiana contra *S. enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus* (datos no mostrados). Este resultado podría atribuirse, al menos en parte, a la baja concentración de curcumina empleada en las películas estudiadas (0,02% p/v en las dispersiones filmogénicas). Niamsa y Sittiwet (2009) informaron que en un extracto acuoso de *Curcuma longa* el valor de concentración mínima inhibitoria es de 4-32 g/L contra *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, Lawhavinit y col., (2010) informaron sobre un extracto alcohólico de cúrcuma con una concentración mínima inhibitoria de 30 ppm contra *S. aureus*. La ausencia de actividad antimicrobiana también puede atribuirse a las

interacciones entre la curcumina y la gelatina. Salgado y col. (2012) informaron que las películas de proteínas de girasol -que contienen compuestos fenólicos- no mostraron propiedades antimicrobianas debido a las importantes interacciones entre los compuestos fenólicos y las proteínas en películas a pH alcalino.

III.3.4 Conclusiones

El agregado de curcumina a la formulación activó a las películas de gelatina con importantes propiedades antioxidantes y les otorgó la capacidad de identificar cambios en el pH del medio circundante. Estos dos comportamientos resultaron más interesantes en las películas preparadas usando mezclas de etanol-agua como solvente. Estos materiales comestibles podrían utilizarse como envases activos e inteligentes (“smart packaging”) para alimentos, ya que podrían proporcionar información sobre el deterioro de los alimentos indirectamente a través de la medición del pH y ampliar la vida útil de los alimentos a través de las propiedades antioxidantes del material.

III.4 Películas proteicas aditivadas con antocianinas extraídas de repollo colorado (*Brassica oleracea*)

III.4.1 Introducción

Entre los colorantes naturales alternativos a los colorantes sintéticos, se encuentran las antocianinas, que también modifican su coloración según el pH del medio donde se encuentran.

Las antocianinas representan un gran grupo de pigmentos naturales, hidrosolubles y no tóxicos, que se hallan en las vacuolas celulares de prácticamente todos los tejidos vegetales (hojas, flores, frutos, tallos y raíces). Son los responsables de los colores rojo, morado y azul de numerosos frutos silvestres como las moras, las frambuesas, los arándanos, las grosellas, y de otras frutas como las cerezas, las ciruelas, las uvas rojas y las manzanas rojas. Además, se han encontrado en las flores y hojas de infinidad de plantas y en tubérculos y hortalizas como la remolacha y el repollo entre otros (Janik y col., 2007; Wrolstad, 2004; Liu y col., 2004; Francis, 1989) (Figura III.4.1). Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas gracias a sus llamativos tonos rojos y púrpuras, la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta, contra la contaminación viral y microbiana, y de camuflaje frente a los herbívoros que se sienten atraídos por el color verde de las plantas, pero que no pueden percibir la luz de color rojo (Mahdavi y col., 2014).



Figura III.4.1. Ejemplos de hojas, flores, frutos, tallos y raíces que contienen antocianinas.

Desde el punto de vista químico, las antocianinas son los glicósidos de las antocianidinas. Éstas, por su parte, son compuestos polifenólicos derivados del catión flavilio y pertenecen a una clase superior de moléculas llamadas flavonoides (Clifford, 2000). La Figura III.4.2

ilustra las estructuras químicas generales de estos compuestos.

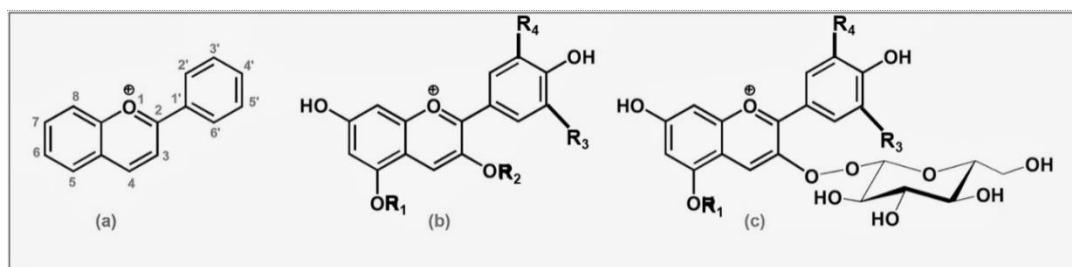


Figura III.4.2. Estructura general de: **a.** catión flavilio, **b.** antocianidina y **c.** antocianina.

En la Figura III.4.3 se presenta la estructura molecular de las antocianidinas más comunes: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina, en las cuales los grupos R_1 y R_2 de la estructura general (Figura II.4.2) representan H y los R_3 y R_4 representan H, -OH o -OCH₃ (Figura II.4.3). Los nombres asignados derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez (Wu y col., 2004).

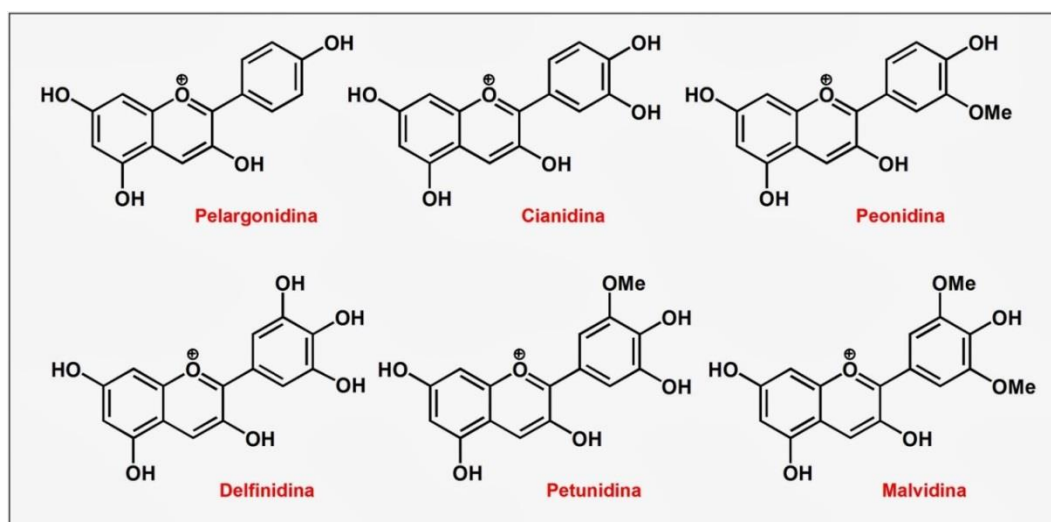


Figura III.4.3. Estructura molecular de las antocianidinas más comunes: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico;

o aromáticos: p-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzoico. La combinación de las seis antocianidinas mencionadas previamente con los diferentes azúcares y ácidos, genera aproximadamente 150 antocianinas que abundan en la naturaleza (Wrolstad y col., 2005).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Stintzing y col. (2002) demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación también producen efectos en el tono de coloración de las antocianinas. El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianidinas (Figura III.4.4). Las antocianinas a pH ácido ($\text{pH} < 4$) se presentan como catión flavilio y presentan colores en la gama de los rojos intensos gracias a la conjugación extendida entre los dos fragmentos aromáticos. Esto permite la absorción de luz visible con una longitud de onda variable ($480 - 550 \text{ cm}^{-1}$), dependiendo de los sustituyentes de los anillos. A pH entre 4 y 5, sin embargo, estas moléculas experimentan un ataque nucleofílico sobre el C2 por parte de una molécula de agua, y adoptan una configuración de tipo carbinol pseudobase. Esta molécula queda carente de color debido a la ausencia de conjugación entre el fragmento monocíclico y el resto de la molécula, lo que impide la absorción de luz visible. Por encima de pH 5 vuelven a adquirir colores intensos en la gama de los azules, verdes y amarillos, gracias al predominio de conformaciones neutras o aniónicas con una fuerte conjugación (Figura III.4.4).

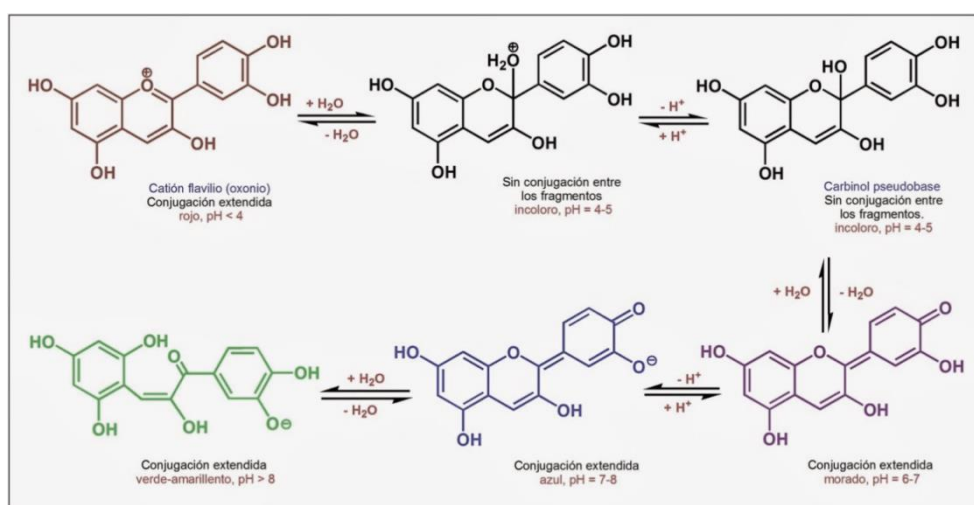


Figura III.4.4. Efecto del pH en la estructura de las antocianinas, en la conjugación y sus cambios en la coloración.

Recientemente, las antocianinas han atraído un gran interés en la industria alimentaria y de la salud debido a sus diversos beneficios potenciales atribuidos a su actividad antioxidante (Awika y col., 2005; Wu y col., 2004), el mejoramiento visual, reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, efecto cardioprotector, antimutagénico, antiinflamatorio y en algunos casos antimicrobianos (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Por estas propiedades así como por su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano.

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes sintéticos y de otros agentes bioactivos, su estabilidad está determinada por la temperatura, la presencia de oxígeno, la luz, la concentración de azúcares libres y la actividad acuosa de la matriz, entre otros factores. Debido a esta baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos es limitada (Wrolstad, 2000; Cevallos-Casals y Cisneros Zeballos, 2004). Teniendo en cuenta estas características, la gran demanda de estos colorantes naturales para la industria alimentaria induce a la búsqueda de distintas técnicas para su aislamiento. En este sentido, varias técnicas cromatográficas se han estudiado. Sin embargo, en el caso de métodos tales como la cromatografía en columna y la electroforesis, el escalado no resulta rentable (Coutinho y col., 2004). Uno de los métodos más utilizados para obtener antocianinas es la extracción sólido-líquido. El carácter polar de estas moléculas permite su solubilidad en variados solventes tales como alcoholes, acetona y agua (Kechinski y col., 2010; Astrid, 2008). En la actualidad existe la tendencia de utilizar directamente los extractos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos presentan propiedades antioxidantes. El repollo colorado es una fuente rica de antocianinas con fuerte actividad antioxidante (Ahmadiani y col., 2014; Podsędek y col., 2008; Boo y col., 2012), cuyas estructuras principales son, en la mayoría de los casos, glicósidos de cianidina (Wu & Prior, 2005). También se han identificado glucósidos de delphinidina, pelargonidina y peonidina (Charron y col., 2007; McDougall y col., 2007) y derivados acilados (Clifford, 2000; Wu y Prior, 2005). En el caso de la formulación de materiales, la utilización de los extractos como solventes en las dispersiones filmogénicas resulta una manera interesante y económica para activarlos con nuevas propiedades. Así numerosos extractos han sido utilizados para formar películas con actividades antioxidantes y antimicrobianas para la protección de

alimentos (Hafidh y col., 2011; Li y col., 2014; Wang y col., 2012; Wiczowski y col., 2015). Por otra parte, hay pocos estudios donde se utilizan los extractos para obtener envases inteligentes comestibles (Biji y col., 2015). Yoshida y col. (2014) desarrollaron un indicador colorimétrico en base a quitosano para indicar cambios de pH con el agregado de antocianinas derivadas de extractos de uva para ser utilizadas como indicadores de metabolitos derivados de crecimiento microbiano tales como n-butilato, ácido láctico y ácido acético. Veiga-Santos y col. (2011) desarrollaron películas biodegradables en base a almidón de yuca plastificadas con sacarosa y azúcar invertido que contenían extractos de uva como indicadores de pH. En este sentido, Golasz y col. (2013) también obtuvieron películas de almidón de yuca con antocianinas provenientes de uvas y las emplearon para determinar el deterioro en carne de cerdo. Y Silva-Pereira y col. (2015) desarrollaron películas de quitosano y almidón de maíz con extractos de antocianinas y evaluaron su potencial uso como indicador de deterioro en pescado.

El **objetivo** de este trabajo fue desarrollar películas de gelatina capaces de detectar cambios de pH del medio utilizando extractos de repollo colorado (*Brassica Oleracea*) como solvente y evaluar la posible activación de los materiales resultantes con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Teniendo en cuenta que el repollo colorado puede contener entre 9 y 24 antocianinas diferentes (Arapitsas y col., 2008; Pliszka y col., 2009), es de esperar que la utilización de distintos solventes de extracción permita obtener una composición distintiva en los extractos y esto pueda afectar la funcionalidad de los materiales resultantes.

III.4.2 Materiales y métodos

III.4.2.1 Materiales

Se trabajó con gelatina bovina comercial ("Royal", Kraft Foods, Argentina) como biopolímero y glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante. Se utilizó repollo colorado (*Brassica oleracea*) obtenido de un comercio de la zona. Como solventes se utilizaron agua destilada y etanol 96% (Purocol, Argentina). Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

III.4.2.2 Preparación de los extractos de antocianinas

Se prepararon dos extractos de antocianinas, uno usando agua y otro empleando etanol como solventes. Para su preparación se pesaron 50 g de repollo colorado cortado con cuchillo y se trituró en una picadora (Moulinex, Argentina) con 50 ml del solvente (agua o etanol). El producto obtenido se colocó en un vaso de precipitado, se agregaron 50 ml adicionales del solvente utilizado y se agitó durante media hora. Por último, se filtró primero con colador para eliminar las partículas gruesas y luego con papel de filtro (Whatman n° 1). Los extractos así obtenidos se denominaron Ant-a y Ant-e según si el solvente empleado fue agua (a) o etanol (e).

III.4.2.3 Caracterización de los extractos

III.4.2.3.1 Determinación de la concentración de antocianinas

La concentración de antocianinas en ambos extractos se determinó utilizando el método de diferencia de pH. Como se mencionó anteriormente, las antocianinas experimentan transformaciones reversibles con los cambios de pH, manifestando un llamativo cambio en la absorbancia. Este método utilizado por primera vez por Flueki y Francis (1986) permite una rápida y exacta medición de las antocianinas totales. Para ello, una alícuota de 200 μ l de extracto de antocianina se mezcló con 7 ml de *buffer* a pH 1,0 (cloruro de potasio 0,025 M, ajustado con ácido clorhídrico) y otra con 7 ml de un *buffer* a pH 4,5 (acetato de sodio 0,4 M, ajustado con ácido acético). La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (530 nm) en los *buffers* utilizados es proporcional al contenido de antocianinas (Wrolstad, 1993). Posteriormente, y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debido a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. Para las medidas se utilizó un lector de placas UV-VIS (Biotek, modelo Synergy HT) contra un blanco de agua destilada. Teniendo en cuenta que las antocianinas del repollo colorado derivan de glucósido de cianidina, las concentraciones se expresaron como mg cianidina-3-glucósido cada 100 mL de extracto de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Ecuación II.4.1 y Ecuación II.4.2) (Hrazdina y col., 1977).

$$\Delta A = (A_{530} - A_{700})_{pH: 1,0} - (A_{530} - A_{700})_{pH: 4,5} \quad \text{Ecuación III.4.1}$$

$$\text{Concentración de antocianinas} = \frac{\Delta A \cdot PM \text{ promedio} \cdot FD \cdot 1000}{\epsilon \cdot L} \quad \text{Ecuación III.4.2}$$

Dónde:

ΔA : Cambio en la absorbancia de la muestra en los distintos *buffers* a 530 y 700 nm.

PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol

FD: Factor de dilución

ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900 ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)

1000: factor de conversión de gramos a miligramos

L: camino óptico (cm)

III.4.2.3.2 Determinación del perfil de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los extractos obtenidos se filtraron a través de una jeringa con un filtro de 0,45 micras (Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos). El equipo consta de un detector de red de diodos (Waters 2998) equipado con una bomba (Waters 1525) y columna 4,6 mm y 250 ml, (Phenomenex, CA). El ensayo se realizó a 40 °C con un flujo constante de 0,5 ml/min. La fase móvil estaba compuesta por 5% (v/v) de ácido fórmico (A) y metanol (B). El gradiente de elución elegido fue el utilizado por Wu y col. (2004): 0-2 min: 5% B; 2-10 min: 5-20% B; 10-15 min: 20% B; 15-40 min: 20-30% B. La detección se realizó a 520 nm.

III.4.2.3.3 Determinación de los espectros de absorción de luz UV-visible

Los extractos se diluyeron (1:2) empleando el solvente correspondiente agua o etanol. Se determinaron y registraron los espectros de absorción de esas diluciones entre 200 y 700 nm con un lector de placas Biotek, modelo Synergy HT. Se realizaron triplicados para cada uno de los extractos.

III.4.2.4 Formación de las películas

Se prepararon películas por *casting*. Se solubilizaron 5 g de gelatina en 50 ml de agua destilada a 100 °C, y luego de 15 minutos de agitación se adicionaron 50 ml del extracto obtenido (acuoso o alcohólico) y glicerol (1,25 g) a temperatura ambiente. Ajustando su pH en 6, con un tiempo total de agitación de 30 minutos. Obteniendo así las dispersiones filmogénicas acuosas o hidroalcohólicas, G+Ant-a y G+Ant-ea respectivamente. Un volumen de 10 ml de cada dispersión filmogénica se colocó en placas de Petri (64 cm^2) y se secó en estufa de convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante tres horas. Las películas resultantes fueron acondicionadas 48 h a 20°C y 58 % HR previo a

su caracterización. Como control se obtuvieron películas de gelatina utilizando como solvente agua y etanol –muestras G-a y G-ea respectivamente- a pH 6, pero sin el agregado de los extractos; estas películas ya fueron presentadas en la sección III.3.2.2. En la Tabla III.4.1 se muestra la nomenclatura de las películas y la composición de las dispersiones filmogénicas estudiadas.

Tabla II.4.1. Nomenclatura y composición de las dispersiones filmogénicas ensayadas.

| Película | Gelatina (% p/v) | pH | Ant-a (%v/v) | Ant-e (%v/v) | Agua (v/v) | Etanol (v/v) |
|----------|------------------|----|--------------|--------------|------------|--------------|
| G-a | 5 | 6 | - | - | 100 % | - |
| G+Ant-a | 5 | 6 | 50% | - | 50% | - |
| G-ea | 5 | 6 | - | - | 50% | 50% |
| G+Ant-ea | 5 | 6 | - | 50% | 50% | - |

III.4.2.5 Caracterización de las películas

Las películas fueron caracterizadas según su espesor, opacidad, color, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas en tracción y la respuesta frente a cambios de pH como se describe en la sección III.1.2.3. Se evaluó la respuesta de las películas frente a distintos sistemas *buffers* como se describió en la sección III.2.2.5. Además se determinó capacidad antioxidante por captura de radical ABTS^{•+} y reducción del complejo Fe-TPTZ (FRAP) y la actividad antimicrobiana tal cual se describió en la sección III.3.2.3.1 y sección III.3.2.3.2.

III.4.2.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el test de Tukey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$ utilizando el software Statgraphics Plus versión 5.1 (Statgraphics, EE.UU.).

II.4.3 Resultados y discusión

II.4.3.1 Extractos de antocianinas

Los extractos obtenidos se presentaron límpidos y de coloración violeta. En la Tabla III.4.2 se presenta la concentración de antocianinas en dichos extractos y sus respectivos valores de pH.

Se puede apreciar que la concentración de antocianinas correspondiente a los extractos alcohólicos fue casi 7 veces superior que la correspondiente al extracto acuoso demostrando una mayor eficiencia extractiva del alcohol en comparación con el agua. Además, a simple vista pudo observarse que la intensidad de la coloración de Ant-e era mayor que la de Ant-a. Resultados similares encontraron Chandrasekhar y col. (2012) cuando extrajeron antocianinas de repollo colorado en diferentes solventes: alcohol, metanol, agua y mezclas de estas soluciones a distintos pHs.

Tabla III.4.2. Concentración de antocianinas y pH de los extractos de repollo colorado obtenidos empleando agua (a) o etanol (e) como solventes: Ant-a y Ant-e.

| Muestra | Concentración (mg/L) | pH |
|---------|-------------------------|------------------------|
| Ant-a | 0,6 ± 0,06 ^a | 6,0 ± 0,1 ^b |
| Ant-e | 4,0 ± 0,4 ^b | 5,7 ± 0,2 ^a |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

En la Figura III.4.5 se observan los cromatogramas obtenidos por HPLC de los extractos de repollo colorado. El extracto obtenido usando agua como solvente (Ant-a) presentó un único pico a un tiempo de retención de 29,3 min mientras que el extracto alcohólico (Ant-e) mostró dos picos, uno que se encuentra a un tiempo de retención de 26,9 min y otro el a los 29,6 minutos, que coincide con el extraído con agua. Teniendo en cuenta las características de separación de la columna, los dos picos podrían atribuirse a distinta formas de antocianinas probablemente derivadas de cianidinas (Wu & Prior, 2005). La relación de áreas de los cromatogramas para ambos extractos (3:1) confirman la mayor efectividad de extracción del alcohol, que aparentemente además de extraer las antocianinas presentes en el extracto acuoso, estaría extrayendo otras formas presentes en el repollo colorados. Ahmadiani y col (2014) analizaron los extractos de siete variedades de repollo colorado extraídos en una mezcla de acetona/cloroformo, y por

ensayos de HPLC con un gradiente de ácido fórmico (4.5 % p/v) y acetonitrilo identificaron derivados de cianidina-3-diglucósido-5-glucósido de acuerdo con trabajos publicados anteriormente por Park y col, (2014) y Wu y Prior, (2005). Arapitsas y col. (2008) también encontraron en las antocianinas a la cianidina como agliconas, mono o diglicósiladas.

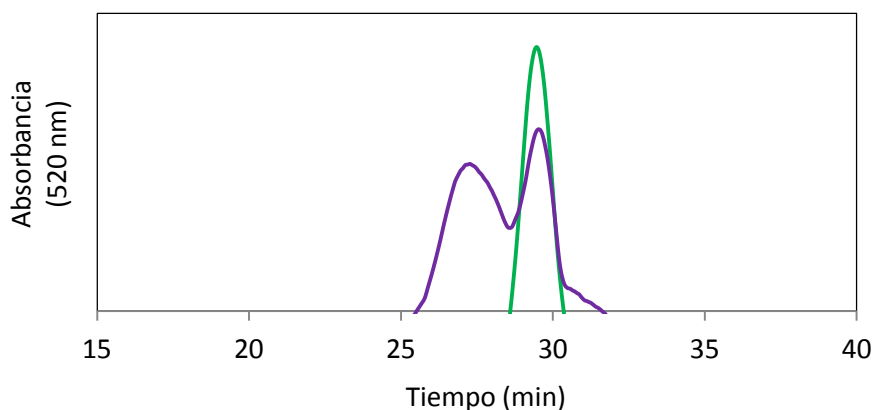


Figura III.4.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los extractos de antocianinas de repollo extraídas con agua (a) y etanol (e) como solventes: — Ant-a, — Ant-e. La detección se realizó a 520 nm.

En la Figura III.4.6 se observan los espectros de absorción de luz UV-Vis de los diferentes extractos obtenidos. En ambas muestras se observan picos a 205, 230, 245 y a 325 nm. En Ant-a además se observa un pico a 265 y otro a 600 nm y para el extracto obtenido con solución alcohólica (Ant-e) se presenta un pico a 275 nm y otro a 540 nm. Estas diferencias en los picos pueden atribuirse a la composición diferente de los extractos acuosos y alcohólicos. Ikan (1991) atribuyó que la coloración violeta de las antocianinas a pH neutro está influenciada por el número de grupos hidroxilo, que el color rojo anaranjado se atribuye principalmente a la pelargonidina, el rojo intenso de la cianidina y el azulado a los derivados de delphinidina.

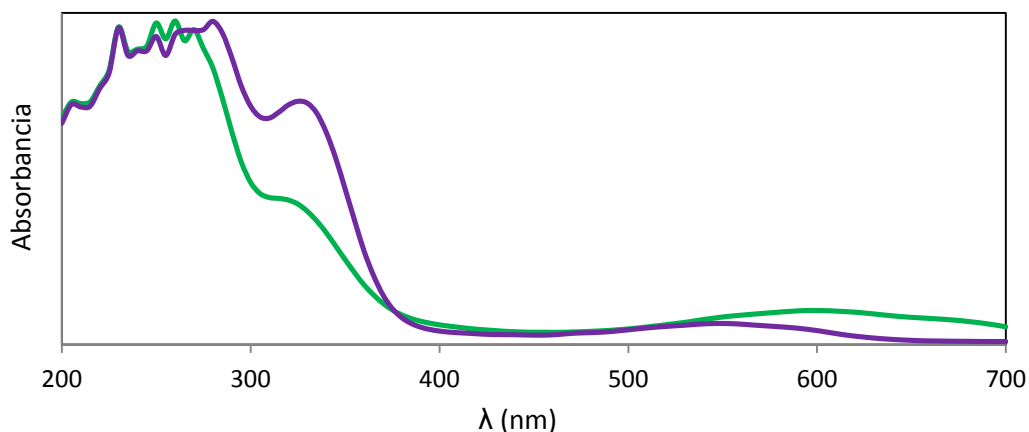


Figura III.4.6. Espectros de absorción de luz UV-Vis de los extractos de antocianinas de repollo extraídas con agua (a) y etanol (e) como solventes: — Ant-a, — Ant-e.

III.4.3.2 Aspecto y propiedades ópticas de las películas con extracto de repollo colorado

Todas las películas estudiadas con y sin el extracto de repollo colorado (con los distintos solventes utilizados) adicionado a la dispersión filmogénica resultaron transparentes, se pudieron remover fácilmente de las placas y resultaron de fácil manipulación (Figura III.4.7). A pesar que las dispersiones filmogénicas presentaban una leve coloración violácea proveniente del extracto de repollo colorado a ese pH, este color ya no se vio reflejado en las películas obtenidas luego del proceso de secado a 60°C. Muchos autores han estudiado esta característica de las antocianinas, que frente a la luz o exposiciones a temperaturas mayores a 30°C los pigmentos pierden su coloración (Alighourchi y Barzegar, 2009; Bolívar y Cevallos-Casals, 2004; Shaked-Sachray y col., 2002).

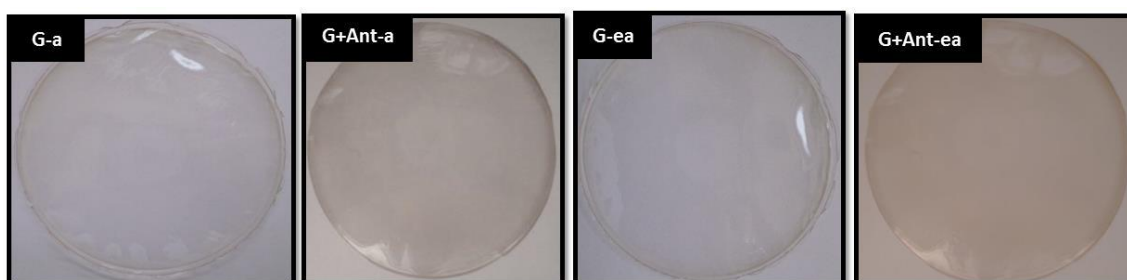


Figura III.4.7. Fotografías de películas de gelatina aditivadas con extracto de repollo colorado obtenido en distintos solventes (agua y etanol) y sus respectivos controles: G-a, G+Ant-a, G-ea, G+Ant-ea.

Wiczowski y col. (2015) mostraron cómo durante los procesos de fermentación y calentamiento se provocó una disminución en el contenido de todas las antocianinas analizadas en extractos de repollo colorado y que esta intensidad de la disminución

dependía de la estructura química de cada uno de los compuestos presentes en el extracto. Por otra parte, Pereira y col. (2015) desarrollaron películas de quitosano y polivinil alcohol con antocianinas de repollo colorado como materiales capaces de responder a cambios de temperatura.

III.4.3.3 Respuestas de las películas con extracto de repollo colorado frente al pH del medio

En la Figura III.4.8 se presentan los cambios de coloración de las películas de gelatina con extractos de repollo colorado frente a los distintos *buffers* de pH: 1 a 14. Puede observarse que las dos películas presentaron cambios en su coloración. A valores de pH menores a 4 la coloración de las películas fue rosada y a valores de pH fuertemente alcalinos ($\text{pH} > 11$) la película toma un color amarillento. Estos cambios de coloración resultaron más notorios en las películas formuladas con el extracto de antocianinas en etanol (G+Ant-ea) (Figura III.4.8. B).

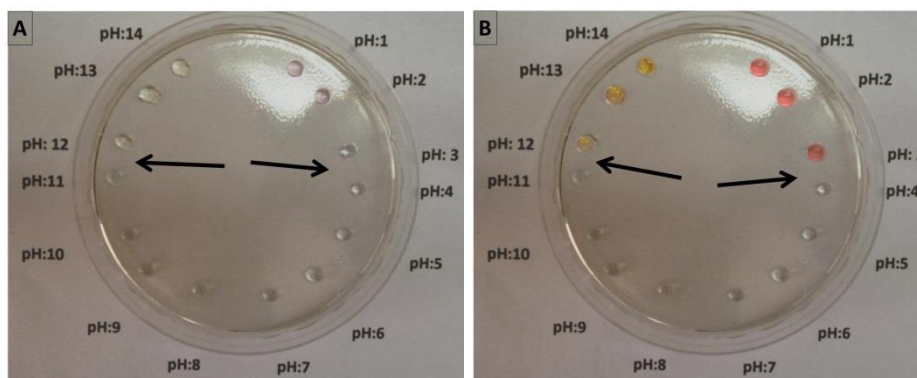


Figura III.4.8 Respuestas de las películas de gelatina con extractos de antocianinas obtenidos en distintos solventes: **A.** G+Ant-a y **B.** G+Ant-ea frente a los cambios de pH con distintos sistemas *buffers* (pH: 1 a 14)

Las respuestas de las películas con extractos de antocianinas obtenidos en distintos solventes -agua y etanol- frente a distintos medios (líquidos, gaseosos y semisólidos) ácidos o alcalinos se presentan en la Figura III.4.9. En esta figura se corrobora lo observado en la Figura III.4.8. Las películas de gelatina con extracto acuoso de antocianinas modificaron su coloración de transparente a un leve color rosado frente a todos los medios estudiados de pH ácido. Frente al medio líquido alcalino las películas proteicas cambiaron su coloración a color amarillo. Cuando se las enfrentó a medios gaseosos y semisólidos de pH alcalino su coloración se modificó a un tono verdoso-amarillento (Figura

III.4.9). Aunque, para estas películas los cambios de coloración fueron tenues y no resultaron notorios en los medios estudiados (Figura III.4.9).

Cuando las películas contienen el extracto alcohólico de antocianinas los cambios resultaron más notorios. Frente a medios ácidos (líquidos, gaseosos y semisólidos) la coloración de las películas cambió de transparente a color rosa (Figura III.4.9). Mientras que frente a medios líquidos alcalinos la coloración se tornó amarillenta y en los medios gaseosos y semisólidos a pH alcalinos la coloración se modificó a un tono verde más fuerte que el observado en las películas preparadas con extracto acuoso.



Figura III.4.9 Respuestas de las películas de gelatina con extractos de antocianinas obtenidos en distintos solventes (G+Ant-a y G+Ant-ea) frente a diferentes medios (líquidos, gaseosos y sólidos) ácidos y alcalinos.

Todos los cambios de coloración resultaron reversibles coincidiendo con los resultados de Pereira y col. (2014). Cabe destacar que cuando se enfrentó las películas (G+Ant-a y G+A-ea) a medios gaseosos y semisólidos la coloración no llegó a ser amarillenta como la obtenida con el medio líquido, esto podría deberse a que en el medio líquido el pH es superior a 11. Según Yoshida y col. (2014), a pH>11 la coloración de las antocianinas se vuelve amarilla y en valores menores de pH el color es verdoso. Probablemente con NaOH

se superó el valor de pH 11 y por esta razón la coloración no fue de la tonalidad verde esperada.

III.4.3.4 Efecto del extracto de antocianinas de repollo colorado en las propiedades fisicoquímicas de las películas

En la Tabla III.4.3 se presentan los datos obtenidos de espesor y susceptibilidad al agua de los materiales en estudio. El espesor de las películas no se vio afectado cuando se reemplazó agua por el extracto acuoso ($p > 0,05$), sin embargo los valores de espesor aumentaron cuando el solvente utilizado fue etanol ($p < 0,05$), tal como se describió anteriormente en la sección II.3.3.3. No se observaron diferencias significativas cuando hay antocianinas presentes en ambas formulaciones (G+Ant-a y G+Ant-ea).

El contenido de agua de las películas de gelatina resultó menor al incorporar etanol o los extractos de antocianinas en la formulación, sin encontrarse diferencias significativas en sus valores $\approx 18\%$ ($p > 0,05$), y siendo éstos similares a los encontrados por Tongnuanchan y col. (2015) en películas de gelatina de pescado. La solubilidad en agua de las películas sólo se modificó al agregar el extracto alcohólico de antocianinas, aumentando en un 42% la solubilidad de las películas ($p < 0,05$). El resto de las películas -G-a, G+Ant-a y G-ea - no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con valores de entre $\approx 36-39\%$ de solubilidad. Esto indicaría que la formulación G+Ant-ea es la que posee mayor carácter hidrofílico. Una alta solubilidad en agua puede ser una ventaja para algunas aplicaciones, como en la formulación de *sachets* solubles o donde se necesite liberar compuestos activos.

Tabla III.4.3. Espesor, contenido de agua, solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua de películas de gelatina con y sin extracto de repollo colorado obtenido con distintos solventes.

| Propiedades | G-a | G+Ant-a | G-ea | G+Ant-ea |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Espesor (μm) | $49,7 \pm 4,4^a$ | $51,3 \pm 4,6^a$ | $60,1 \pm 6,2^b$ | $55,5 \pm 5,3^{ab}$ |
| MC (%) | $21,8 \pm 0,5^b$ | $18,7 \pm 1,1^a$ | $17,2 \pm 0,6^a$ | $19,1 \pm 1,0^a$ |
| S (%) | $39,2 \pm 4,3^a$ | $37,2 \pm 2,6^a$ | $35,6 \pm 0,6^a$ | $62,0 \pm 3,7^b$ |
| WVP ($10^{-10} \text{gH}_2\text{O s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{Pa}^{-1}$) | $0,68 \pm 0,04^a$ | $0,65 \pm 0,06^a$ | $1,11 \pm 0,34^a$ | $1,2 \pm 0,1^a$ |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Con respecto a la permeabilidad al vapor de agua no hubo diferencias significativas en todas las formulaciones estudiadas ($p > 0,05$) a pesar de las diferencias en los valores de solubilidad. Aunque la muestra G+Ant-ea presenta los mayores valores de permeabilidad al vapor de agua.

En la Figura III.4.10 se muestran las curvas tensión vs. elongación de los materiales desarrollados. Las películas G-a presentaron propiedades mecánicas moderadas con valores de tensión de ≈ 3 MPa y de elongación que llegan al $\approx 160\%$, similares a las informadas en la sección III.1.3.3. Estas propiedades se vieron afectadas cuando se reemplazó agua por el extracto acuoso de antocianinas de repollo colorado (G+Ant-a). Los valores de tensión aumentaron al doble ($p < 0,05$), sin encontrarse diferencias significativas en la elongación de las películas ($p > 0,05$) y con una disminución del módulo de *Young* de $\approx 1,3$ a $0,2$ MPa ($p < 0,05$).

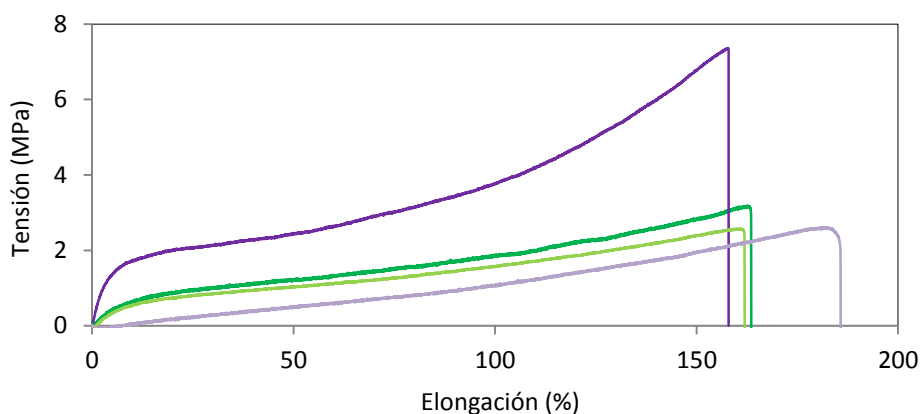


Figura II.4.10. Gráfico de las propiedades mecánicas, Tensión vs. Elongación de películas de gelatina con y sin extractos de antocianinas obtenidos en distintos solventes: — G-a, — G+Ant-a, — G-ea, — G+Aea.

Las películas que contenían etanol en su formulación (G-ea) presentaron menores valores de tensión ($\approx 30\%$) con respecto a las películas realizadas con agua como solvente (G-a) ($p < 0,05$), sin observarse diferencias significativas en la elongación de las películas ($p > 0,05$). Sin embargo cuando se reemplazó la solución alcohólica por el extracto de antocianinas en el mismo solvente no se observaron diferencias significativas en los valores de tensión ($p > 0,05$). Aunque sí se presentaron diferencias en la elongación de las películas, G+Ant-ea tuvo valores 15% más altos que los de G-ea ($p < 0,05$). Además, el módulo de *Young* aumentó 6 veces su valor cuando se reemplazó la solución alcohólica por el extracto de antocianinas en solución alcohólica ($p < 0,05$). Probablemente al tener mayor interacción

con el agua estas películas aumenten su elongación y disminuyan su tensión a la rotura. La interacción entre proteínas y aditivos como plastificantes y agentes antioxidantes, pueden influir en las propiedades mecánicas de las películas ya que las cadenas proteicas y los solventes utilizados desempeñan un papel importante en estas propiedades (Li y col., 2014). Evidentemente el extracto alcohólico de repollo colorado actúa plastificando la matriz proteica.

III.4.3.5 Actividad antioxidante y antimicrobiana de las películas

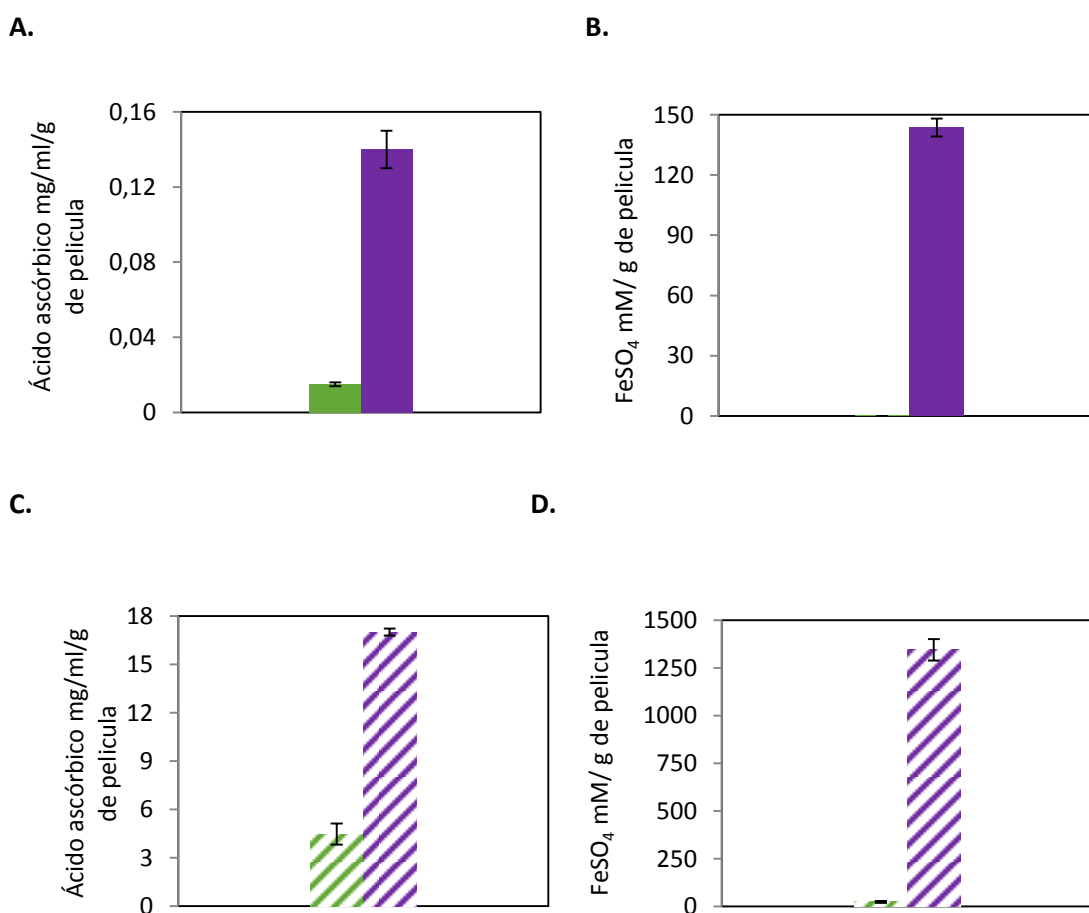


Figura III.4.11. Propiedades antioxidantes (medidas mediante ensayos ABTS y FRAP) de películas a base de gelatina (G) y antocianinas de repollo colorado (G+Ant) extraídos en distintos solventes agua (a), ■ G-a, ■ G+Ant-a (paneles A y B) y etanol (e): ▨ G-ea, ▨ G+Ant-ea (paneles C y D).

En la Figura III.4.11 se muestran los valores de la capacidad antioxidante de las películas obtenidos por ABTS^{•+} y FRAP. Las películas control con agua como solvente (G-a) presentaron muy baja capacidad antioxidante en las dos técnicas utilizadas. Cuando se

reemplazó el agua por el extracto de antocianinas de repollo colorado en solución acuosa (G+Ant-a) el valor de la capacidad antioxidante aumentó 8 veces en el ensayo de ABTS^{•+} y casi 150 veces en el ensayo de FRAP, comparado con G-a. Cuando las dispersiones filmogénicas se obtuvieron empleando la mitad de volumen de etanol (G-ea) el valor de la actividad antioxidante aumentó en las dos técnicas utilizadas (en ABTS^{•+} de 0,015 a 4,47 mg/ml de ácido ascórbico por g de película y para la técnica FRAP de 0,01 a 23,5 mM de FeSO₄ por g de película), como se observó en la sección II.3.3.4. Además, cuando se reemplazó por el extracto alcohólico de antocianinas los valores de la capacidad antioxidante de estas películas (G+Ant-ea) aumentan aún más, llegando a valores de ≈17 mg/ml de ácido ascórbico por g de película para ABTS^{•+} y de ≈1300 mM de FeSO₄ por g de película para FRAP.

Los datos de la actividad antioxidante de estos compuestos varían enormemente en la bibliografía (Singh y col., 2006). Los resultados presentados en esta Tesis pueden compararse con los publicados por Jacob y col. (2011) quienes evaluaron las propiedades antioxidantes de extractos de repollos verde y colorado obtenidos por diferentes procedimientos de extracción. Estos autores describieron que la variación en el contenido de antioxidantes de los vegetales del género *Brassica* depende de varios factores tales como la variedad, la madurez a la cosecha, el estado y las condiciones de conservación del suelo después de la cosecha. Las películas desarrolladas presentaron una importante capacidad antioxidante a pesar del proceso llevado a cabo para su obtención (calentamiento a 60 °C durante 3 h). Esto se observó en ambos solventes utilizados.

Por otra parte, las películas obtenidas con extractos de repollo colorado en ambos solventes no presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. enteritidis*, *E. coli*, *B. cereus*, y *S. aureus*. En distintos trabajos se ha demostrado la actividad antimicrobiana de las antocianinas de extracto de repollo colorado extraídas con distintos solventes frente a distintas cepas bacterianas y diferentes hongos. Por ejemplo, Boo y col. (2012) describieron actividad frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *V. parahaemolyticus*. Mientras que Hafidh y col. (2011) encontraron actividad antifúngica en extractos de antocianinas con una concentración de 700 mg/ml frente a *T. rubrum* y *A. terreus*. La carencia de actividad antimicrobiana en las muestras analizadas en esta Tesis podría deberse a la baja concentración de antocianinas en los extractos obtenidos.

III.4.4 Conclusiones

Se obtuvieron extractos de repollo colorado con diferente concentración y composición de antocianinas, empleando agua o etanol como solventes. Estos extractos pudieron ser incorporados satisfactoriamente en la formulación de películas de gelatina. Las propiedades mecánicas de las películas se vieron afectadas principalmente cuando se reemplazó agua por el extracto acuoso, obteniendo películas más resistentes y menos elongables que las que contenían el extracto alcohólico. El agregado de los extractos de antocianinas le confirió a las películas de gelatina importantes propiedades antioxidantes y le otorgó la capacidad de indicar cambios en el pH del medio circundante. Estos dos comportamientos resultaron más importantes en las películas preparadas con el extracto alcohólico de antocianinas.

Las películas biodegradables y/o comestibles desarrolladas resultan atractivas para ser empleadas en el envasado activo e inteligente de productos alimenticios, ya que por sus importantes propiedades antioxidantes podrían prolongar la vida útil del producto envasado, y por su capacidad de respuesta frente a cambios de pH podrían brindar información sobre el deterioro microbiano que ha sufrido el alimento.

Estas películas podrían ofrecer una alternativa eficiente detectar deterioro en alimentos por cambios en su pH. Ya que además se trata de un material proteico, biodegradable, con la adición de un colorante de origen natural.

IV. Películas proteicas con capacidad de respuesta a cambios de temperatura.

IV. Películas proteicas con capacidad de respuesta a cambios de temperatura.

IV.1 Introducción

La temperatura juega un rol muy relevante en la industria alimentaria ya que puede modificar en gran medida la calidad e incluso la seguridad de los alimentos durante su procesamiento, distribución y almacenamiento, por oxidación de lípidos, modificación de viscosidad, texturas y *flavors*, crecimiento de microorganismos, etc. (Maciel y col., 2012; Ellouze y Augustin 2010). Es por esto que el control de este parámetro durante las distintas etapas del procesamiento de alimentos es tan importante para asegurar la calidad de los alimentos que compramos y consumimos. Especialmente durante la distribución, almacenamiento e incluso hasta el momento anterior al consumo, los envases pueden contribuir a realizar ese control. Para esto se requiere del desarrollo de materiales capaces de indicar los cambios de temperatura a los que fue o está siendo sometido el alimento (Sarley, 2011). Los campos de aplicación de estos materiales se centran principalmente en productos que necesiten refrigeración durante su cadena de distribución u otra condición térmica (como es el caso de bolsas de plaquetas sanguíneas que requieren almacenarse a 22 °C), o algunos productos *gourmet* que se aconsejan consumir a una temperatura determinada. En este contexto, la inclusión de tintas termocrómicas a los materiales poliméricos se presenta como una alternativa promisoría para el desarrollo de materiales capaces de indicar cambios de temperatura (Seebboth y col., 2014).

Las tintas termocrómicas poseen en su composición pigmentos de diferente naturaleza que pueden cambiar sus espectros de absorción frente a distintas temperaturas o cierto rango de temperaturas (Boscolo, 2006). En su mayoría contienen colorantes leuco o cristales líquidos.

Los colorantes leucos son los que pasan de un estado incoloro (leuco) a un estado coloreado con el cambio de la temperatura como producto de la reorganización de la estructura molecular de un pigmento. En general están compuestos por un formador de color, un revelador y un co-disolvente para producir un cambio de color reversible que es impulsado por las interacciones entre estos compuestos. La activación de estos colorantes está determinada por la temperatura en la que el solvente cambia de estado sólido a

líquido, posibilitando que los diversos pigmentos formadores del color estén en contacto por debajo de la temperatura de transición (estado coloreado) o se encuentren separados por encima de esta temperatura (estado decolorado). Típicamente, el punto de fusión del co-disolvente aplicado determina la temperatura en la que se produce el cambio de color y este es reversible (Hajzeri y col., 2015).

Por su parte los cristales líquidos termocrómicos muestran los diferentes colores al reflejar selectivamente la luz blanca que incide sobre ellos. Éstos se convierten desde negro (o incoloro) hasta el rojo, con una determinada temperatura, y a medida que ésta aumenta, cambian hacia los demás colores del espectro visible con la siguiente secuencia: naranja, amarillo, verde, azul, violeta; antes de volverse negro o incoloro de nuevo, a una temperatura aún más alta. Los cambios de color son reversibles y en el enfriamiento produce la misma secuencia pero a la inversa (de la Calzada Lorenzo, 2016). Estas tintas presentan una sensibilidad mucho mayor que las de los colorante leucos (Sarley, 2011).

Según la naturaleza de las tintas, los cambios en la coloración pueden ser reversibles o irreversibles (Boscolo, 2012). Las tintas termocrómicas reversibles se utilizan generalmente como indicadores de confort, por ejemplo en etiquetas para bebidas refrigeradas en donde la etiqueta cambia su coloración al alcanzar la temperatura óptima para ser consumida (Vanderroost y col., 2014); mientras que las irreversibles se emplean en indicadores de abuso térmico para alimentos y medicamentos, que requieren almacenarse a una determinada temperatura (por ejemplo que conserven la cadena de frío) (Kim y col., 2012). Resulta evidente que la selección de la tinta termocrómica a utilizar depende en gran medida de la aplicación que se está intentado realizar.

Existen distintas estrategias para incorporar fácilmente las tintas termocrómicas en matrices poliméricas previamente formadas, entre ellas se pueden mencionar: impresión, pintado o inmersión. Algunas tintas termocrómicas comerciales están inmersas en formulaciones tipo barnices que vienen acompañadas por monómeros en su formulación y, una vez aplicadas sobre el material, requieren un posterior tratamiento con radiación ultravioleta (UV) para polimerizar y secar la tinta aplicada (Zabala y col., 2015). Durante estos procesos se podrían establecer interacciones entre los componentes de las tintas termocrómicas agregadas y los de los materiales poliméricos, así como provocar modificaciones estructurales en los materiales preformados y en la efectividad de los componentes capaces de indicar cambios de temperatura (Wanihsuksombat y col., 2010).

En el caso de los tratamientos con radiación UV, estos afectan la estructura de las proteínas y también la funcionalidad de las películas si el tratamiento se realiza una vez formado el material proteico. La radiación UV es absorbida por los dobles enlaces y los anillos aromáticos, causando la formación de radicales libres en aminoácidos como tirosina y fenilalanina, y puede conducir a la formación de enlaces covalentes entre las cadenas polipeptídicas (Gennadios y col., 1998; Rhim y col., 1999; Otoni y col., 2012).

Los efectos de la radiación UV se han estudiado en películas de proteínas de soja, maní y arvejas, gluten de trigo, zeínas, albúmina, caseinato de sodio, suero lácteo, gelatina de pescado (Díaz y col., 2016; Gennadios y col., 1998; Gueguen y col., 1998; Liu y col., 2004; Micard y col., 2000; Otoni y col., 2012; Rhim y col., 1999 y 2000; Schmid y col., 2015). Si bien en la mayoría de los casos la radiación UV logró mejorar las propiedades mecánicas de las películas y modificar su coloración, los resultados fueron variables dependiendo de la composición aminoacídica y la estructura molecular de las proteínas utilizadas (Gennadios y col., 1998) y de las condiciones experimentales de los tratamientos utilizados (Schmid y col., 2015; Díaz y col., 2016).

El **objetivo** de este capítulo fue desarrollar películas proteicas capaces de indicar cambios de temperatura por aplicación de tintas termocrómicas sobre las películas previamente formadas y analizar el efecto que este proceso produce sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1. Materiales

IV.2.1.1. Fuente proteica.

Teniendo en cuenta que el proceso de aplicación de la tinta termocrómica involucra un tratamiento UV y que este produce modificaciones en la estructura proteica dependientes de la composición aminoacídica y de la estructura de la proteína se comenzó trabajando con dos fuentes proteicas diferentes: un aislado proteico de soja (**SPI**, SUPRO 500-E, DuPont N & H, Brasil) y gelatina bovina comercial (**G**, Royal, Kraft Food, Argentina).

IV.2.1.2. Tintas termocrómicas

Las tintas termocrómicas fueron gentilmente proporcionadas por la empresa Megacolor S.R.L. (<http://www.megacolor.com.ar>), y aplicadas en sus instalaciones ubicadas en Florida, Buenos Aires, Argentina. Se emplearon dos tintas termocrómicas: T16 que cambia de rosado a rosa más claro al superar los 16°C y T33 cuya coloración cambia de negra a gris cuando la temperatura es mayor que 33°C. Lamentablemente no se contó con la composición química de las mismas debido a cuestiones de confidencialidad, sólo conocemos que la tinta estaba dispersa en una formulación que contenía acrilatos.

Según bibliografía, la mayoría de los recubrimientos UV involucran el uso de monómeros y oligómeros basados en acrilato, que se polimerizan a gran velocidad directamente sobre el sustrato (papel, madera, plásticos, vidrio, etc.). En general las formulaciones están compuestas por una mezcla de un oligómero base —que imparte la mayor parte de las propiedades básicas al material final—, monómeros —que diluyen la formulación hasta llevarla a una viscosidad conveniente y ayudan a formar los enlaces cruzados entre los segmentos del oligómero—, y los aditivos. Estos últimos pueden ser pigmentos, cargas, agentes humectantes u otros materiales, y se añaden para impartir propiedades específicas y ayudar en el proceso o mejorar el desempeño (Boscolo, 2012).

IV.2.2. Formación de las películas

Se obtuvieron películas por *casting* a partir de dispersiones filmogénicas acuosas conteniendo 5% p/v de las respectivas proteínas y 1,25% p/v de glicerol (25% p/p respecto de la proteína). En el caso de gelatina, la proteína se dispersó inicialmente en la mitad de volumen de agua a 100°C y luego se completó el volumen con la cantidad adecuada de glicerol y agua a temperatura ambiente, ajustando el pH en 6. En el caso de soja, el aislado proteico y la cantidad adecuada de glicerol se dispersaron en agua a temperatura ambiente y se ajustó el pH en 10,5 en base a estudios previos (Echeverría, 2012; Ortiz, 2015).

Finalmente, 28 mL de cada una de las dispersiones filmogénicas se colocaron en placas de acrílico (180 cm²) y se secaron en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60°C durante 4 h.

Aplicación de las tintas termocrómicas: Las tintas se aplicaron sobre las películas proteicas previamente formadas por medio de rodillos, a una velocidad de 40 m/min y se secaron usando radiación UV (120 W/cm lineal, que estimamos correspondería a 0,18 J/cm²) en la

empresa Megacolor S.R.L. Como controles se obtuvieron, películas proteicas sin la aplicación de las tintas, sometidas o no al tratamiento UV. En la Tabla IV.1 se muestran las formulaciones estudiadas y su nomenclatura correspondiente.

Las películas resultantes se acondicionaron durante 48 h a 20°C y 58% HR, en un desecador conteniendo una solución saturada de NaBr previo a su caracterización.

Tabla IV.1. Nomenclatura y síntesis de la composición y tratamientos a los que fueron sometidas las películas estudiadas

| Muestra | Proteína | Plastificante | pH | Tinta termocrómica | Tratamiento UV |
|-----------------------------|--------------------------|---------------|------|--------------------|----------------|
| G | Gelatina | Glicerol | 6 | - | - |
| G_{UV} | | | | - | ✓ |
| G+T16_{UV} | | | | T16 | ✓ |
| G+T33_{UV} | | | | T33 | ✓ |
| SPI | Aislado proteico de soja | Glicerol | 10,5 | - | - |
| SPI_{UV} | | | | - | ✓ |
| SPI+T16_{UV} | | | | T16 | ✓ |
| SPI+T33_{UV} | | | | T33 | ✓ |

IV.2.3 Caracterización de las películas

Las películas estudiadas fueron caracterizadas según su espesor, color, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas en tracción y calorimetría diferencial de barrido según la metodología descrita en la sección III.1.2.3. Su caracterización se completó con las siguientes técnicas.

IV.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se observó el corte transversal y ambas superficies de las películas. Las muestras se cortaron en tiras de 1 cm x 3 cm, y se fracturaron sumergiéndolas en nitrógeno líquido. Las probetas así obtenidas se dispusieron sobre una cinta adhesiva doble faz, se metalizaron con oro en un Sputter Coater S150B (Edwards, Inglaterra) y se observaron en un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda) con un voltaje de aceleración de 10 kV, con aumento de 500X.

IV.2.3.2 Ángulo de contacto

Se evaluó la hidrofobicidad superficial de las películas a temperatura ambiente a través de la medida del ángulo de contacto con un goniómetro Ramé-Hart Modelo 250 (Ramé-Hart Instruments, Estados Unidos). Una gota de 5 μL de agua de calidad milli Q se colocó sobre la superficie de las películas con una jeringa y se fotografió al instante. Se utilizó un analizador de imágenes para medir el ángulo formado entre la base, compuesta por la superficie de la película en contacto con la gota de agua, y la tangente a la gota de agua (Figura IV.1). Cada valor de ángulo de contacto corresponde al valor medio de los ángulos de contacto iniciales medidos en ambos lados de la gota. Los resultados informados son los valores promedio de nueve mediciones realizadas. Se determinaron los ángulos de contacto en ambas superficies de las películas.

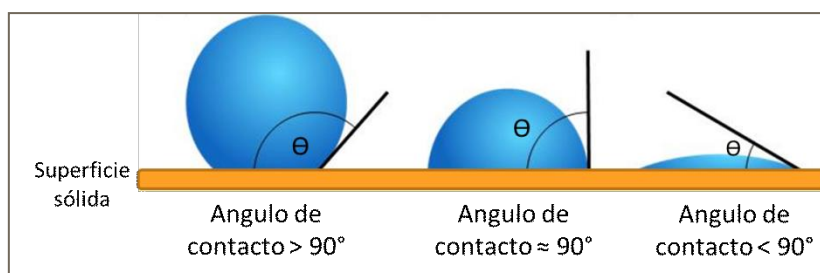


Figura IV.1. Esquema de gotas de líquido colocadas sobre la superficie de un sólido y la medida de sus ángulos de contacto.

IV.2.3.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Se registraron los espectros infrarrojos entre 4000 y 650 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} utilizando un espectrómetro infrarrojo (Nigaoli, EE.UU) equipado con un prisma de cristal ATR. Los espectros fueron analizados con software Omnic Spectra (Nicolet Instrument Co., Madison, WI, USA). Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado y sobre ambas superficies de las películas.

IV.2.3.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Se determinó la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas en *buffers* con distinta actividad química con el fin de analizar las interacciones que estabilizan a las películas proteicas, según el método descrito por Mauri y Añón (2006),

con algunas modificaciones. Se estudió la solubilidad en agua y cuatro sistemas *buffer* diferentes: i) BF: *buffer* fosfato diácido de sodio 0,1M (NaH_2PO_4), ii) BFD: BF + dodecilsulfato de sodio 0,1% p/v (SDS, Anedra, Argentina), iii) BFU: BF + urea 6M (Riedel-deHaën, Alemania), y iv) BFDUM: BF + SDS 0,1% p/v + urea 6M + 2-mercaptoetanol al 2,5% v/v (Sigma-Aldrich, Alemania), todos a pH 7,5. Trozos pequeños de películas (≈ 50 mg), se pesaron y colocaron en tubos conteniendo 1 ml de solvente, que se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente las suspensiones se centrifugaron a 9000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes por el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando curvas de calibración con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) en agua y en cada uno de los sistemas *buffer* utilizados. La solubilidad se expresó como porcentaje de proteína soluble (% p/p) respecto a la cantidad total de proteína teórica presente en cada película. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

IV.2.3.5 Opacidad

La opacidad de las películas se calculó dividiendo la absorbancia de la película a 500 nm (medida en un lector de placas Biotek HT Synergy) por el espesor de la película (mm) (Cao y col., 2007). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

IV.2.3.6 Capacidad de respuesta de las películas frente a cambios de temperatura

La respuesta frente a cambios de temperatura se observó colocando los materiales en contacto directo con superficies enfriadas o calentadas por debajo o encima de las temperaturas donde producían el cambio las tintas empleadas (16 y 33°C respectivamente). Las respuestas se registraron con una cámara fotográfica (Kodak M853, Estados Unidos), se cuantificaron los parámetros de color tal como se describe en la Sección III.1.2.3.3 y se determinaron sus espectros de absorción UV-visible según la metodología descrita en Sección III.1.2.3.4.

IV.2.3.7 Calorimetría diferencial de barrido

Se determinó mediante un calorímetro TA 2010 Q100 v9.8 Build 296 (TA Instrument, New Castle, Delaware, EE.UU), descrito en la sección III.1.2.7. Se prepararon cápsulas de aluminio con aproximadamente 5 mg de película, se sellaron herméticamente y se

escanearon a 10°C/min en el rango de -80 a 150°C. Se determinaron los termogramas (flujo de calor vs. temperatura) y se calculó utilizando el software de análisis universal V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., EE.UU.) las temperaturas de pico y sus correspondientes endotermas. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

IV.2.4 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) 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 Statgraphics Plus (versión 5.1, Statgraphics, USA).

IV.3 Resultados y discusión

IV.3.1 Apariencia de las películas proteicas de soja y gelatina

En la Figura IV.2. se muestra la apariencia a 20°C de las películas de soja y gelatina control, sometidas al tratamiento UV requerido para la aplicación de las tintas, y con las tintas T16 y T33, que llegaron a poder obtenerse. En el caso de la gelatina sólo se pudo obtener la película control, con su apariencia incolora y transparente característica, y la que contenía la tinta T16. El tratamiento UV sólo, o con el agregado de T33 deterioró a la película totalmente (motivo por el cual no aparecen sus fotografías en la Figura IV.2). El agregado de la tinta T16 posiblemente haya contribuido a protegerla del efecto de la radiación. Algunos autores sugieren que el tratamiento UV puede provocar la oxidación y ruptura de enlaces peptídicos en gelatina. Bhat y col. (2009) manifestaron que con un tiempo de exposición suficiente, se puedan generar radicales libres que induzcan cambios moleculares y fragmentación. Por su parte, Kuan y col. (2013) han sugerido que la irradiación de las películas proteicas puede causar ciertos cambios permanentes como desaminación, descarboxilación, modificación de grupos amino o restos ácidos, escisión de las cadenas peptídicas e incluso su agregación. Por su parte, Kato y col. (1992) al estudiar los efectos de la radiación UV sobre colágeno y sus péptidos informaron que la fragmentación se debe a la oxidación de prolina (aminoácido abundante en la gelatina). Las películas de soja (SPI) sí pudieron soportar los tratamientos UV y de impresión, y adoptaron la coloración de cada una de las tintas a temperatura ambiente, rosada con T16

y negra con T33. Es evidente la dependencia del efecto que causa el tratamiento UV con la composición aminoacídica y la estructura de cada proteína. A partir de estos resultados, se decidió continuar trabajando sólo con las películas formadas con aislados proteicos de soja, que pudieron manipularse sin dificultad para su caracterización.

A continuación se discuten por separado el efecto del tratamiento UV y la aplicación de las tintas.

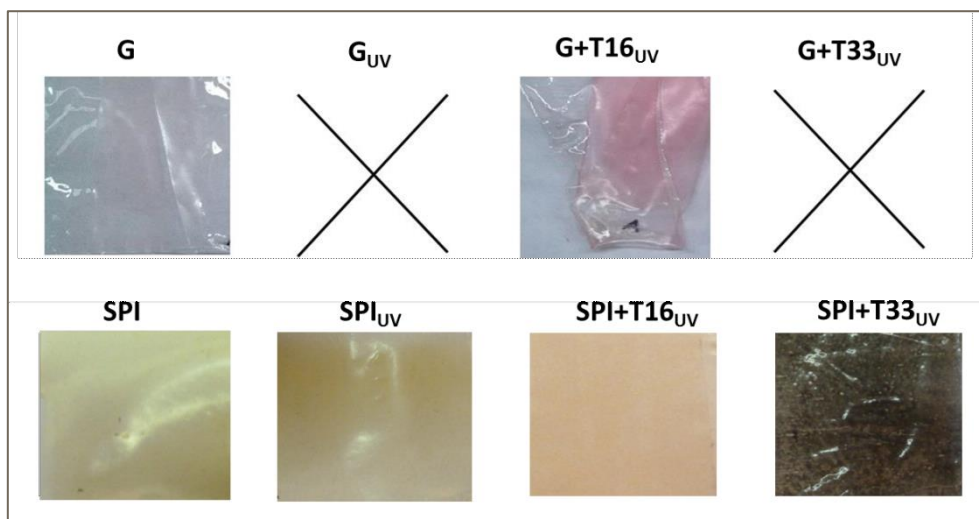


Figura IV.2. Apariencia de las películas de gelatina (G) y soja (SPI) control, con tratamiento UV requerido para aplicar las tintas (G_{UV} y SPI_{UV}) y con la aplicación de las tintas T16 y T33 ($G+T16_{UV}$, $SPI+T16_{UV}$, $G+T33_{UV}$, y $SPI+T33_{UV}$), a 20°C.

IV.3.2 Efecto del tratamiento UV sobre las propiedades de películas proteicas de soja

El tratamiento UV realizado sobre las películas previamente formadas por *casting*, idéntico al requerido para aplicar las tintas, provocó un aumento significativo del espesor de $68,8 \pm 5,2$ a $81,8 \pm 4,1$ μm , lo que posiblemente pueda atribuirse a cambios estructurales de las proteínas durante el proceso.

En la Tabla IV.2 se presentan los parámetros de color y el valor de opacidad de las películas SPI y SPI_{UV} . Las películas proteicas de soja control presentaron un leve brillo y una coloración amarillenta característica, que es atribuida a los compuestos co-extraídos con las proteínas durante la obtención de los aislados proteicos (Salgado y col., 2010), caracterizada por un alto valor de b^* , bajos valores de a^* y una luminosidad importante (L^*).

Tabla IV.2. Parámetros de color (L^* , a^* , b^* y ΔE^*) y opacidad de las película de soja control y las tratadas con el tratamiento UV requerido para aplicar las tintas (SPI y SPI_{UV} respectivamente).

| Parámetros de color | L^* | a^* | b^* | ΔE^* | Opacidad |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| SPI | $92,0 \pm 0,8^a$ | $-2,0 \pm 0,1^a$ | $15,0 \pm 0,9^b$ | $14,0 \pm 1,0^b$ | $1,81 \pm 0,09^b$ |
| SPI_{UV} | $93,1 \pm 0,6^a$ | $-1,6 \pm 0,1^a$ | $11,6 \pm 1,1^a$ | $10,4 \pm 1,2^a$ | $1,55 \pm 0,02^a$ |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

El tratamiento UV solo provocó una disminución del parámetro b^* , lo que implica una disminución en la tonalidad amarilla, que repercutió en la disminución de ΔE^* , y una reducción en la opacidad que no llega a verificarse a simple vista dado que la opacidad de las películas de soja ya era baja. A diferencia de estos resultados, Gennadios y col. (1998) y Rhim y col. (2000) observaron que películas de soja irradiadas con UV intensificaban su coloración y opacidad. Posiblemente las diferencias encontradas puedan atribuirse a la potencia de la radiación utilizada en cada trabajo.

Tabla IV.3. Contenido de agua (MC), permeabilidad al vapor de agua (WVP), solubilidad (S), tensión a la rotura (σ_r), elongación a la rotura (ϵ_r) y módulo de Young (E) de las película de soja control y las tratadas con el tratamiento UV requerido para aplicar las tintas (SPI y SPI_{UV} respectivamente).

| Propiedades | SPI | SPI_{UV} |
|--|-------------------|-------------------|
| MC (%) | $20,9 \pm 0,7^b$ | $13,8 \pm 0,3^a$ |
| WVP ($\cdot 10^{10}$ g H ₂ O/m.s.Pa) | $1,40 \pm 0,10^b$ | $0,78 \pm 0,09^a$ |
| S (%) | $31,2 \pm 2,7^a$ | $32,2 \pm 4,1^a$ |
| σ_r (MPa) | $3,6 \pm 0,3^a$ | $6,4 \pm 0,6^b$ |
| ϵ_r (%) | $69,3 \pm 6,5^b$ | $43,2 \pm 4,9^a$ |
| E (MPa) | $0,60 \pm 0,01^a$ | $2,0 \pm 0,2^b$ |



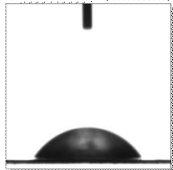
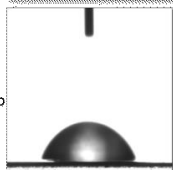
Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

En la Tabla IV.3 se presentan las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas SPI y SPI_{UV} . Las propiedades de las películas control SPI resultaron similares a las obtenidas

previamente en nuestro laboratorio (Echeverría y col., 2014; Ortiz y col., 2013 y Denavi y col., 2009). El tratamiento UV realizado sobre las películas previamente formadas provocó una disminución significativa en el contenido de agua y la permeabilidad al vapor de agua de las mismas, y una mejor importante en la resistencia mecánica de los materiales, sin modificar su solubilidad. Las películas tratadas con UV presentaron un aumento del 78 y 233% en su tensión a la rotura y módulo de Young respecto de las películas control, junto con una disminución en su elongación a la rotura del 38%.

En la Tabla IV.4 se presentan los ángulos de contacto medidos al apoyar una gota de agua sobre las películas SPI y SPI_{UV}. Las determinaciones se realizaron sobre ambas superficies de las películas. Estas medidas se relacionan con la hidrofobicidad superficial de las películas y su humectabilidad (Guerrero y col., 2011).

Tabla IV.4. Ángulo de contacto medido sobre ambas superficies de las películas de soja control y las tratadas con el tratamiento UV requerido para aplicar las tintas (SPI y SPI_{UV} respectivamente).

| Ángulo de contacto | SPI | SPI _{UV} |
|------------------------------------|---|---|
| Superficie superior de la película | 50,6 ± 4,8 ^a  | 57,0 ± 0,6 ^a  |
| Superficie inferior de la película | 34,3 ± 2,0 ^a  | 56,5 ± 2,2 ^b  |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas (p < 0.05) de acuerdo al test de Tukey.

Las películas control (SPI) mostraron ángulos muy diferentes para ambas caras de las películas, que debe relacionarse con su procesamiento por casting. La superficie expuesta al aire durante el secado presenta una hidrofobicidad superficial superior a la de la superficie que ha estado en contacto con el molde acrílico donde se formó la película. El tratamiento UV provocó un aumento significativo en los ángulos de contacto en ambas superficies, lo que implica un aumento de la hidrofobicidad superficial de las películas. Este aumento puede relacionarse con el menor contenido de agua de las películas tratadas y

con algún reacomodamiento estructural de las proteínas producto de cierto entrecruzamiento que se produce con la radiación, y que motiva los importantes cambios observados en las propiedades físicas y mecánicas. Según Choudhary y Balnda (2012), la luz ultravioleta penetra en los materiales varios milímetros, dependiendo de las propiedades ópticas, lo que explica el efecto sobre ambas superficies de las películas, siendo el efecto mayor sobre la superficie más hidrofílica.

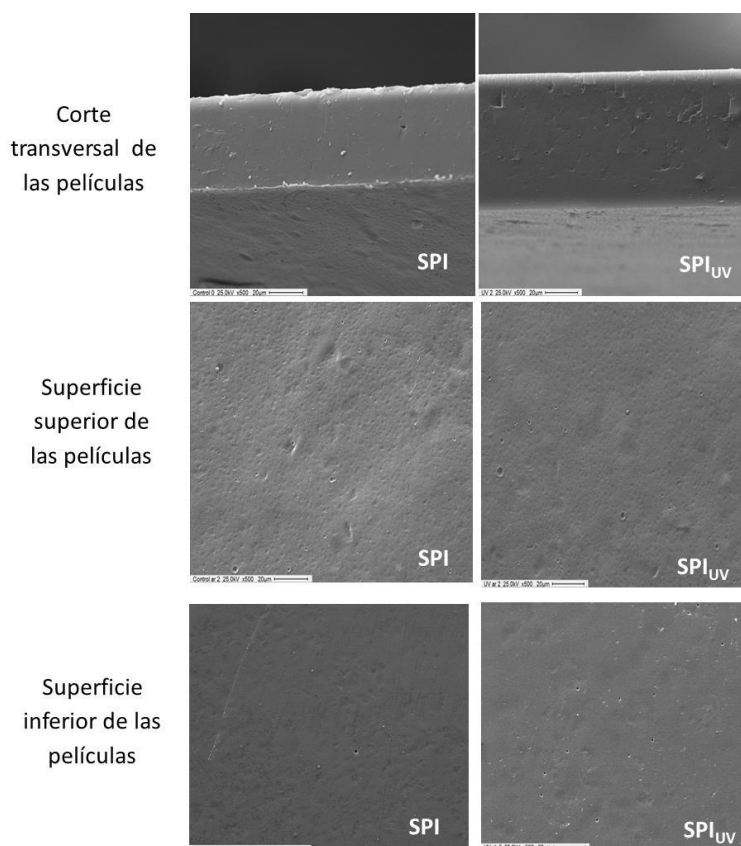


Figura IV.3 Microfotografías electrónicas de barrido (SEM) del corte transversal y ambas superficies de las películas de soja control y las tratadas con el tratamiento UV requerido para aplicar las tintas (SPI y SPI_{UV} respectivamente). Todas las imágenes poseen un aumento de 500x.

En la Figura IV.3 se presentan las microscopías electrónicas de barrido (SEM) que muestran el corte transversal y las superficies superiores e inferiores de las películas. La microestructura de las dos películas se observa compacta, lisa y homogénea, no observándose grandes diferencias para los materiales tratados o no con radiación UV.

A partir de los resultados observados, es evidente que el tratamiento UV provoca la pérdida de agua de la matriz proteica, favoreciendo el entrecruzamiento proteico y volviendo a la matriz más hidrofóbica. El efecto del tratamiento UV sobre películas

proteicas es variado, dependiendo de la naturaleza de las proteínas y de la intensidad de la radiación. Tratamientos con bajas dosis de radiación UV ($0,005 \text{ J/cm}^2$) han logrado mejorar las propiedades mecánicas de películas de gluten, zeínas y albúmina; disminuir la solubilidad en agua de películas de caseinato de sodio, y la permeabilidad al vapor de agua de películas de albúmina (Rhim y col., 1999 y 2000). Liu y col. (2004) también informaron mejoras en las propiedades mecánicas y en la permeabilidad al oxígeno de películas de proteínas de maní luego de tratarlas con radiación UV. Por su parte, Díaz y col. (2016) y Schmid y col. (2015) describieron que los tratamientos de radiación UV (dosis: 12 J/cm^2 y $31,4 \text{ J/cm}^2$ respectivamente) aumentaron la tensión de las películas de proteínas de suero y disminuyeron su solubilidad en agua, pero sin modificar sus propiedades de barrera, en coincidencia con los resultados de Gennadios y col. (1998) con proteínas de soja. Contrariamente, Gueguen y col. (1998) y Micard y col., (2001) no encontraron diferencias significativas en las propiedades mecánicas al tratar las películas de arvejas y gluten con radiación UV (a $0,25 \text{ J/cm}^2$ y 1 J/cm^2 respectivamente), mientras que Ustunol y col. (2006) informaron que la aplicación de altas dosis de radiación UV (324 J/cm^2) en la dispersión filmogénica de proteínas de suero lácteo provocó mejoras en las propiedades mecánicas pero aumentó la permeabilidad al vapor de agua de las películas resultantes.

Con el fin de confirmar si los cambios producidos por el tratamiento UV involucran entrecruzamiento proteico, se analizó el patrón de enlaces que caracteriza a las películas SPI y SPI_{UV} a través de un ensayo de solubilidad diferencial de proteínas en agua y *buffers* con distinta actividad química. Los sistemas utilizados fueron: i) agua, capaz de disolver los polipéptidos libres que no están unidos fuertemente a la matriz; ii) *buffer* fosfato (BF), que permite evidenciar la importancia de las interacciones electrostáticas; iii) *buffer* fosfato con agregado de SDS (BFD) que desestabiliza las interacciones hidrofóbicas y también interactúa con las proteínas modificando su carga neta superficial; iv) *buffer* fosfato con urea (BFU), que modifica principalmente la capacidad de formar puentes de hidrógeno; y v) *buffer* fosfato con urea, SDS y 2-Mercaptoetanol -2ME- (BFDUM), que desestabiliza interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura IV.4. La película SPI, en base a proteína de soja mostró un perfil de solubilidad similar al que informaron Salgado y col. (2010) para películas formadas con el mismo aislado proteico. Cuando las películas de soja control se solubilizaron en agua, se observó $\approx 15\%$ de proteínas solubles, lo que muestra el importante entrecruzamiento de las proteínas durante la formación de la matriz proteica,

mayor que el correspondiente a películas de aislado proteico de amaranto, girasol y soja nativo, que tenían solubilidades mayores (~ 25, 40 y 65%, respectivamente) (Condés y col., 2013; Salgado y col., 2010; Mauri y Añón, 2006). La solubilidad descendió hasta ~ 3-5 % cuando se utilizó el *buffer* fosfato, posiblemente debido a que este medio pudo haber favorecido las uniones iónicas entre las cadenas polipeptídicas produciendo un efecto de *salting out*. Esta baja solubilidad en BF también muestra que las fuerzas electrostáticas no juegan un rol importante en la estabilización de la matriz proteica de soja. Cuando se agregó el detergente SDS al *buffer* fosfato, la solubilidad aumentó levemente, mostrando que la ruptura de las uniones hidrofóbicas no llega a permitir la solubilización de proteínas. En cambio, el agregado de urea provocó un aumento significativo en la solubilidad de las proteínas hasta casi el 50%, evidenciando la importancia de las interacciones no covalentes, principalmente de las uniones puente hidrógeno en la formación de las películas. Finalmente, con el agregado de 2-ME, se logró solubilizar la totalidad de las proteínas, lo que demuestra la relevancia de las uniones disulfuro en la estabilización de estas matrices proteicas. Cabe resaltar, que estas uniones covalentes podrían evitar la liberación de proteínas que estaban estabilizadas por otras interacciones que serían escindidas por los *buffers* antes utilizados, llevando en esos casos a una determinación en defecto. En síntesis, las películas proteicas de soja control estaban estabilizadas principalmente por puentes de hidrógeno y disulfuro.

El tratamiento UV provocó un cambio en el patrón de enlaces de las películas. Se observa una leve disminución en la solubilidad en agua, y un pequeño aumento de la solubilidad en los *buffers* BF y BFD, pero que no marcan una gran diferencia en el comportamiento. Sí se aprecian disminuciones importantes con los *buffers* que contienen urea y mercaptoetanol (BFU y BFDUM), con los que se alcanzan solubilidades hasta 33 y 80%. Es evidente que en estas películas existen otro tipo de interacciones covalentes que no pueden desestabilizarse con los compuestos químicos presentes en los *buffers* y que juegan un papel importante en la estabilización de la red proteica. Rhim y col. (2000) también sugirieron la aparición de enlaces covalentes distintos a los disulfuro dentro de la estructura de las películas tratadas con UV, mientras que otros autores sugirieron que aminoácidos aromáticos, como tirosina y fenilalanina, pueden absorber la radiación UV y recombinarse para formar enlaces covalentes en las proteínas, aumentando el entrecruzamiento (Forbes y Sullivan, 1966; Tomihata y Burczak, 1992).

Estos resultados verifican que el mayor entrecruzamiento observado en las películas SPI_{UV}, induce a la formación de un material más hidrofóbico, con menor contenido de agua, menor permeabilidad al vapor de agua y mejor resistencia mecánica, pero sin modificar su solubilidad en agua.

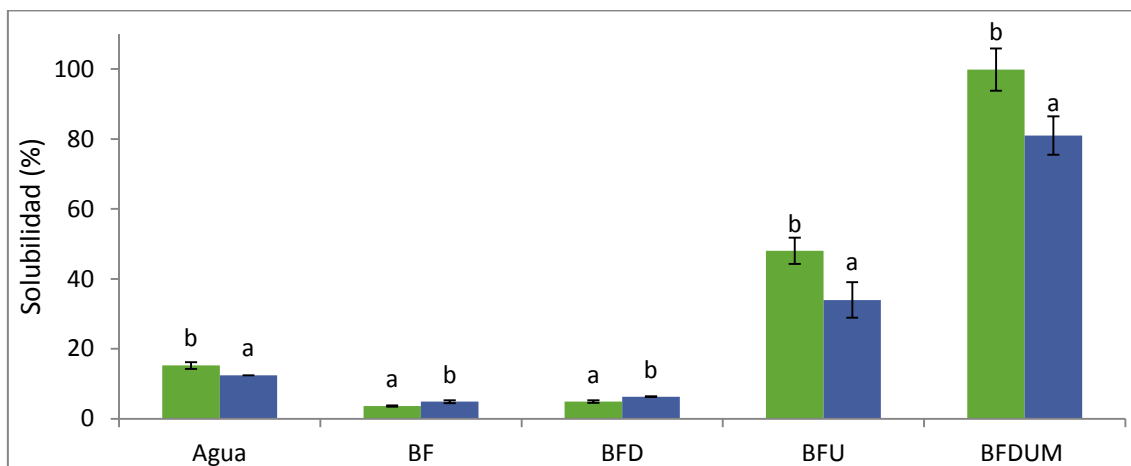


Figura IV.4 Solubilidad diferencial de películas de soja control y las tratadas con el tratamiento UV requerido para aplicar las tintas: ■ SPI y ■ SPI_{UV}. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5.

IV.3.3 Efecto de la impresión de tintas termocrómicas sobre la funcionalidad de películas proteicas de soja

Teniendo en cuenta que el proceso de impresión de las tintas sobre las películas proteicas de soja implicó el tratamiento UV estudiado en la sección anterior, la película SPI_{UV} será el sistema que se usará como control en esta sección.

En la Figura IV.5 se presentan las microscopías electrónicas de barrido (SEM) que muestran el corte transversal y ambas superficies de las películas de soja a las que se le imprimieron las tintas T16 y T33, y se las compara con las correspondientes a la película de soja sometida al mismo tratamiento UV. Las imágenes de los cortes transversales evidencian la formación de una capa superficial porosa y continua sobre la superficie de la película de soja producto de la aplicación de las tintas. En cuanto a las superficies de las películas sobre las que se aplicaron las tintas termocrómicas son menos lisas que las de las películas de soja SPI_{UV} reflejando la naturaleza porosa de la capa superficial, y en el caso de las de SPI+T16_{UV} también se observan manchas de coloración más oscura dispersas en la superficie. En cuanto a las superficies inferiores, las de las películas SPI+T16_{UV} conservan la

aparición lisa de las SPI_{UV} mientras que las de SPI+T33_{UV} son más irregulares, presentando ciertas manchas oscuras y/o poros pequeños. Estas imágenes podrían insinuar, que en el caso de la película impresa con T33, algunos componentes de las tintas podrían estar penetrando la matriz proteica y alcanzando la otra superficie.

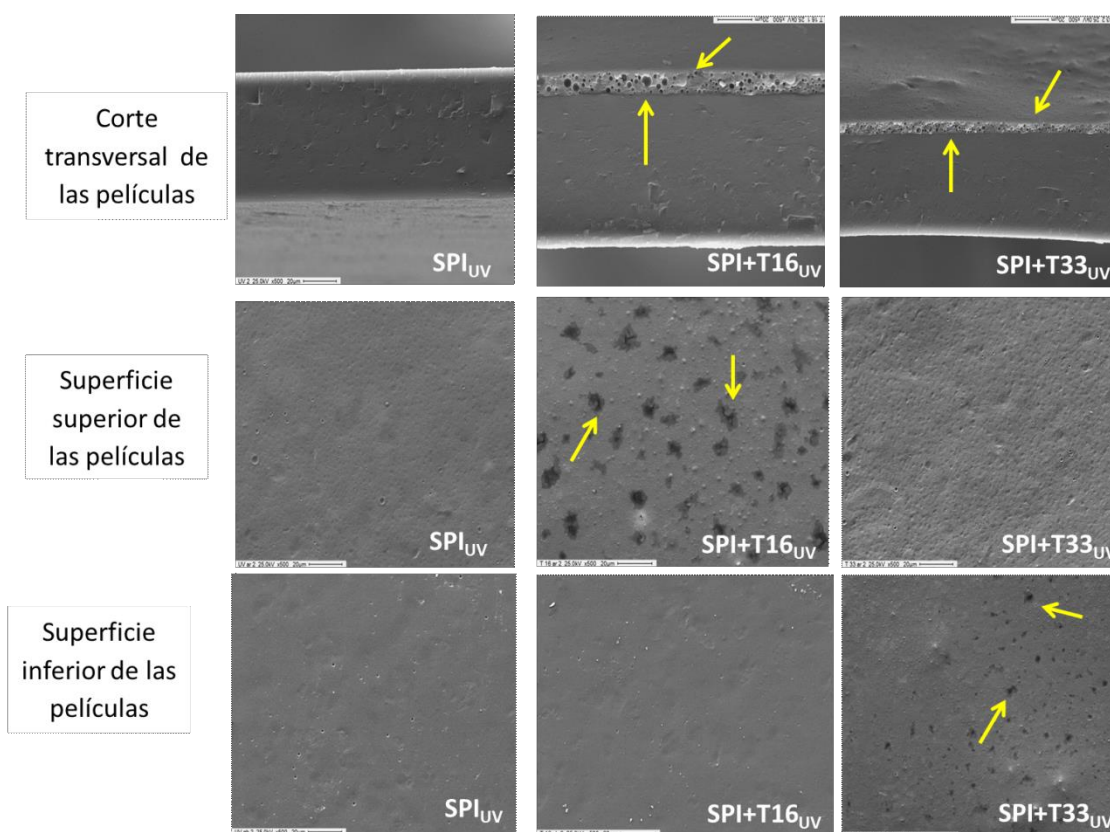


Figura IV.5. Microfotografías electrónicas de barrido (SEM) en el corte transversal y ambas superficies de las películas de sojas tratadas con UV e impresas con las tintas T16 y T33 (SPI_{UV}, SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente). Todas las imágenes poseen un aumento de 500x.

Para confirmar la naturaleza de la capa formada superficialmente al imprimir las tintas sobre las películas proteicas, se analizó la superficie superior por FTIR. En la Figura IV.6. se muestran los espectros obtenidos. En los correspondientes a las películas SPI_{UV} se observan una banda ancha a 3260 cm⁻¹ atribuible a los grupos O-H y N-H libres y ligados capaces de formar puentes de hidrógeno con el grupo carbonilo del enlace peptídico; las bandas características de amida I, amida II y amida III a 1650, 1550 y 1240 cm⁻¹ y otra banda a 500 cm⁻¹, asociada a los enlaces disulfuro (Denavi y col., 2009; Mobili y col., 2009). Los espectros de las superficies de las películas donde fueron impresas las tintas, son diferentes. No se observan las bandas a 3260 cm⁻¹ característica de proteínas ni la de los puentes disulfuro y las otras bandas descritas se ven más atenuadas. Pero aparecen

bandas a 1750 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} que pueden atribuirse a cadenas de carbonos correspondientes a acrilatos (Dietz y col, 1995) y a 1150 cm^{-1} característica de ésteres de polímeros de acrilatos. Estos resultados confirman la información dada por la empresa Megacolor S.R.L. sobre la composición de las tintas utilizadas, y evidencian que las tintas estarían en principio en una matriz de acrilatos, que constituyen la capa sobre la superficie de las películas proteicas vista por SEM.

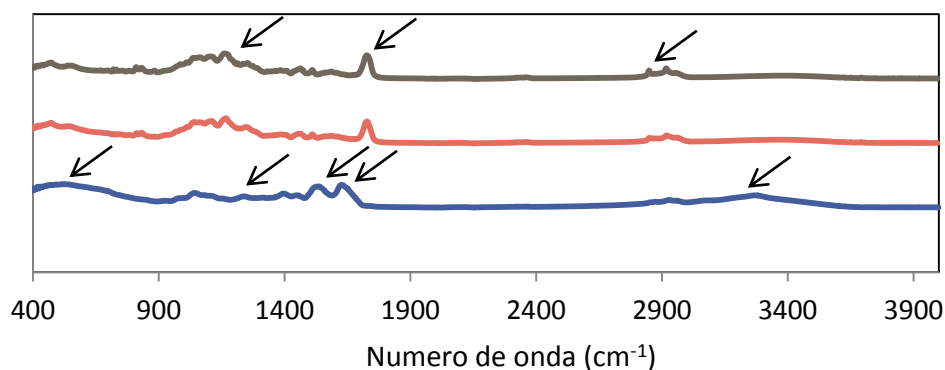


Figura IV.6. Espectros ATR-FTIR de las películas de sojas tratadas con UV e impresas con las tintas T16 y T33 (— SPI_{UV} — $\text{SPI}+\text{T16}_{\text{UV}}$ y — $\text{SPI}+\text{T33}_{\text{UV}}$ respectivamente) a temperatura ambiente

En la Tabla IV.5 se presentan el espesor, contenido de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas. La impresión de la tinta T16 no provocó ninguna modificación en estas propiedades respecto de las de la película SPI_{UV} . Es evidente que la capa de acrilatos que contendría la tinta es muy delgada de manera que las diferencias en el espesor no llegan a generar diferencias significativas en la medida. Por otra parte cabe señalar que si bien ninguna película se desintegró durante el ensayo de solubilidad en agua, en el caso de la $\text{SPI}+\text{T16}_{\text{UV}}$ la tinta (inmersa en la matriz de acrilato) se desprendió en forma de película, sin cambiar la coloración del agua durante el ensayo. Esta observación sugeriría que la capa de acrilato tendría una adherencia más débil a la matriz proteica y que los compuestos que otorgan el color se mantienen atrapados en la matriz de acrilatos, al menos en las condiciones del ensayo de solubilidad. Por su parte, las películas $\text{SPI}+\text{T33}_{\text{UV}}$ presentaron espesores significativamente superiores y solubilidades menores que las películas de soja sometidas al mismo tratamiento UV, pero similares contenidos de agua y permeabilidad al vapor de agua. Y a diferencia de las películas impresas con T16, las T33 quedaron adheridas a las películas de soja en $\text{SPI}+\text{T33}_{\text{UV}}$, lo que sugiere una mayor afinidad

por las proteínas, a través de interacciones que no se desestabilizan en contacto prolongado con agua y que incluso estabilizarían a la matriz, disminuyendo su solubilidad en un $\approx 38\%$, respecto de la película control. El hecho que no se observaron diferencias significativas en las permeabilidades al vapor de agua de las películas impresas respecto del control da indicio de que la capa superficial no estaría ejerciendo una barrera al vapor de agua superior a la de película proteica.

Tabla IV.5. Espesor, contenido de agua (MC), solubilidad (S) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas de sojas tratadas con UV e impresas con las tintas T16 y T33 (SPI_{UV}, SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente).

| Muestra | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP ($\cdot 10^{-10} \text{gH}_2\text{O/m.s.Pa}$) |
|-----------------------|---------------------------|------------------|------------------|--|
| SPI _{UV} | $81,8 \pm 4,1^a$ | $13,8 \pm 0,3^a$ | $32,2 \pm 4,1^b$ | $0,78 \pm 0,09^a$ |
| SPI+T16 _{UV} | $87,8 \pm 6,9^a$ | $15,7 \pm 0,6^a$ | $28,8 \pm 2,4^b$ | $1,05 \pm 0,07^a$ |
| SPI+T33 _{UV} | $103,9 \pm 7,5^b$ | $14,7 \pm 1,2^a$ | $19,9 \pm 1,9^a$ | $0,86 \pm 0,02^a$ |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

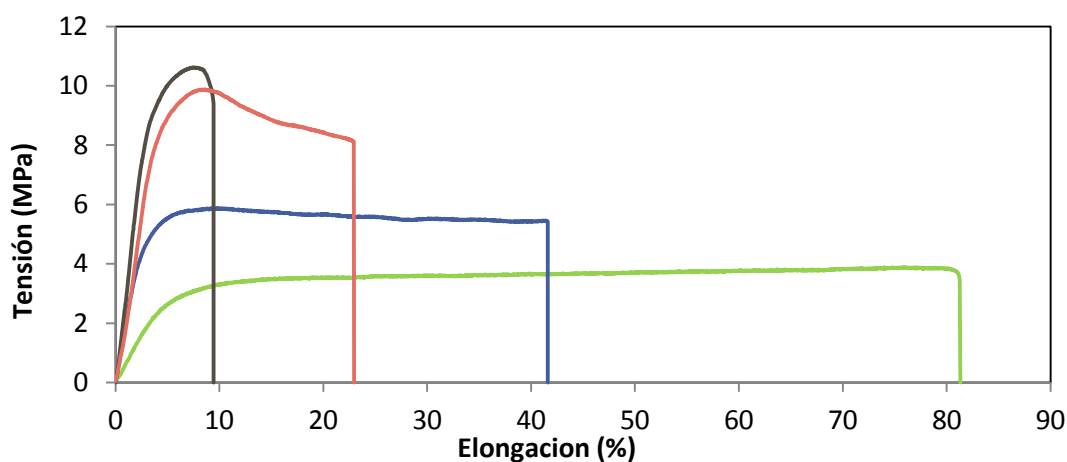


Figura IV.7 Curvas Tensión (MPa) vs. Elongación (%) obtenidas en ensayos en tracción de las películas de sojas tratadas o no con radiación UV e impresas con las tintas: — SPI — SPI_{UV} — SPI+T16_{UV} y — SPI+T33_{UV} respectivamente.

En la Figura IV.7 se muestran las curvas de tensión-deformación (determinadas en ensayos de tracción) de las películas estudiadas, e incluso de la película proteica de soja que no fue sometida a la radiación UV. En la figura se aprecia muy bien, el efecto del tratamiento

UV -descrito en la sección anterior- , con el que se logra mejorar significativamente la tensión a la rotura y el módulo de *Young* en detrimento de la elongación de las películas proteicas. La impresión de las tintas sobre la superficie de las películas provocó un efecto similar, un aumento en la tensión a la rotura y en el módulo de *Young* y una disminución en la elongación a la rotura. Si bien ambas películas alcanzaron valores de tensión a la rotura similares de casi 10 MPa, las SPI+T33_{UV} presentaron módulos de *Young* significativamente más altos ($4,1 \pm 0,9$ MPa vs. $2,1 \pm 0,3$ MPa) y elongaciones a la rotura menores ($10,5 \pm 1,8$ % vs. $20,3 \pm 2,9$ %) que las de SPI+T16_{UV}.

Tabla IV.6. Ángulo de contacto medido sobre las dos superficies de las películas de sojas tratadas con UV e impresas con las tintas T16 y T33 (SPI_{UV}, SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente).

| Ángulo de contacto | Superficie donde fue aplicada la tinta | Superficie inferior |
|-----------------------|--|--|
| SPI _{UV} | $57,0 \pm 0,6^b$  | $56,5 \pm 2,2^c$  |
| SPI+T16 _{UV} | ----  | $48,5 \pm 4,4^b$  |
| SPI+T33 _{UV} | $48,6 \pm 5,5^a$  | $35,9 \pm 5,3^a$  |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

En la Tabla IV.6 se muestran los valores de los ángulos de contacto medidos sobre las dos superficies de las películas de soja tratadas con radiación UV e impresas con las tintas T16 y T33 (SPI_{UV}, SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente). Las películas impresas presentaron ángulos de contacto inferiores en sus dos superficies respecto de las de SPI_{UV}, señalando una menor hidrofobicidad superficial. En el caso de SPI+T16_{UV} la superficie donde se aplicó la tinta es tan hidrofílica y se moja tan fácilmente que esto complicó la medida del ángulo de contacto, mientras que la superficie inferior mostró una disminución menor pero que llega a ser significativamente diferente respecto de la de SPI_{UV}. Por su parte, SPI+T33_{UV} mostró un comportamiento diferente. En el caso de la cara superior, el ángulo de contacto

resultó ser levemente inferior al de SPI_{UV} pero en la inferior esta diferencia se acentuó significativamente. Estos resultados parecieran tener alguna relación con las observaciones hechas por SEM, ya que en las imágenes la superficie superior de SPI+T16_{UV} y la inferior de SPI+T33_{UV} eran las que resultaban más diferentes respecto de las de SPI_{UV}. Para completar la caracterización de las películas, se estudió la solubilidad diferencial de las proteínas involucradas en la estabilización de la matriz proteica en agua y distintos *buffers*. En prácticamente todos los sistemas la solubilidad de las proteínas de las películas impresas fue inferior a las de SPI_{UV}. En agua, BF y BFD los valores son muy bajos, lo que implica que solo el $\approx 8\%$ de los péptidos están débilmente unidos a la red, y que la acción del *buffer* fosfato y el SDS prácticamente no llegan a desestabilizar la matriz proteica. Frente a la acción de BFU que contiene urea en su composición, capaz de romper interacciones no covalentes especialmente puentes de hidrógeno, aumenta el porcentaje de proteínas solubles. En el caso de la película SPI+T16_{UV} la solubilidad es similar a la de la película control SPI_{UV} ($\approx 33\%$), pero para SPI+T33_{UV} la solubilidad es significativamente superior ($\approx 44\%$). Es evidente que en estas películas la interacciones puentes de hidrógeno juegan un papel más importante que en los otros sistemas analizados. Al solubilizar las películas en el *buffer* fosfato con SDS, urea y 2-ME (BFDUM), se logran romper los puentes disulfuro y la solubilidad de las proteínas aumenta significativamente hasta alcanzar el 67 y 53 % para SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente, por debajo de la solubilidad observada en este *buffer* para SPI_{UV} ($\approx 80\%$). Como se mencionó en la sección anterior, el tratamiento UV provoca la formación de otras interacciones covalentes que contribuyen al entrecruzamiento del material, que parecieran estar más favorecidas con la impresión de las tintas y que no logran desestabilizarse con los *buffers* estudiados.

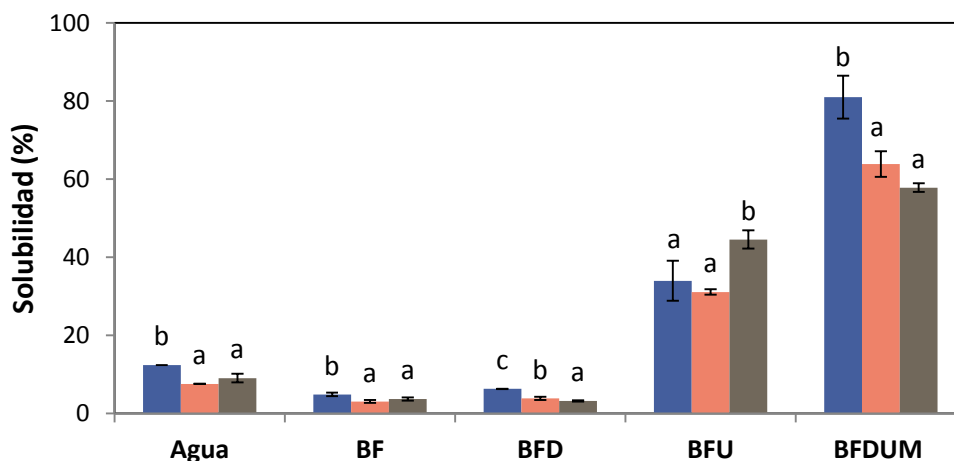


Figura IV.8 Solubilidad diferencial de las películas de sojas tratadas con UV e impresas con las tintas T16 y T33: ■ SPI_{UV}, ■ SPI+T16_{UV} y ■ SPI+T33_{UV}. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5.

Los resultados obtenidos sugieren que el proceso de impresión con las tintas, más allá del tratamiento UV utilizado para su aplicación, modifica la estructura de las películas y en consecuencia modifica sus propiedades, favoreciendo su entrecruzamiento y principalmente mejorando su resistencia mecánica. En el caso de la película SPI+T33_{UV} la modificación pareciera ser más notoria, ya que provoca un aumento más significativo en el módulo de *Young* (lo duplica) y también logra disminuir la solubilidad en agua de las películas. Estos efectos podrían atribuirse a una mayor adhesión de la capa porosa de acrilatos sobre la película proteica, y a que algunos componentes presentes en la formulación de las tintas hayan difundido a través de la matriz proteica.

IV.3.4 Respuesta a los cambios de temperatura de las películas proteicas impresas con tintas termocrómicas

En la Figura IV.9 se muestra la capacidad de las películas estudiadas de cambiar su coloración frente al cambio de temperatura y en la Tabla IV.7, la variación en los parámetros de color que acompañan estos cambios. Las películas SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} cambiaron su coloración al ponerlas en contacto con superficies por encima o debajo de su temperatura de transición. Las SPI+T16_{UV} rosadas a temperatura ambiente, incrementaron fuertemente su coloración tornándose rojizas al ponerlas en contacto con superficies a $T \leq 16^\circ\text{C}$. Este cambio de coloración se evidenció principalmente en un incremento significativo en el valor de a^* . Por otro lado, las películas SPI+T33_{UV}, negras a temperatura

ambiente se volvieron grises con una coloración más suave al contactarlas con superficies a $T \geq 33^\circ\text{C}$. Estas películas presentaron valores significativamente mayores de L^* y menor ΔE^* al enfrentarse a temperaturas mayores a 33°C , sin modificarse en gran medida el resto de los parámetros, indicativo de la pérdida de coloración de la película. Sólo en el caso de la película SPI+T16_{UV} el cambio de coloración fue acompañado por un aumento importante en la opacidad del material (Tabla IV.7).

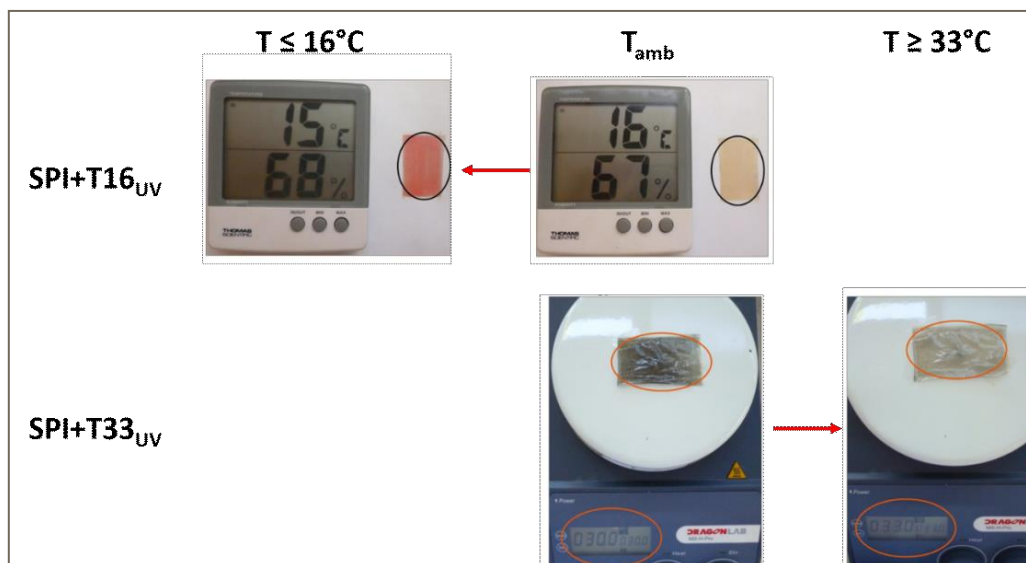


Figura IV.9. Respuesta de las películas proteicas impresas con las tintas termocrómicas SPI-T16_{UV} y SPI-T33_{UV} al someterlas al contacto con superficies a temperaturas por encima y por debajo de sus temperaturas de transición.

Tabla IV.7. Parámetros de color y opacidad de las películas proteicas impresas con las tintas termocrómicas T16 y T33 (SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} respectivamente).

| Muestra | Temperatura | L^* | a^* | b^* | ΔE^* | Opacidad |
|-----------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| SPI+T16 _{UV} | T_{amb} | $88,9 \pm 0,6^c$ | $-0,4 \pm 0,1^c$ | $18,7 \pm 1,1^c$ | $18,4 \pm 1,2^b$ | $4,4 \pm 0,3^a$ |
| | $T < 16^\circ\text{C}$ | $88,5 \pm 1,4^c$ | $5,3 \pm 0,8^d$ | $14,7 \pm 0,6^b$ | $15,7 \pm 1,0^a$ | $12,8 \pm 0,2^b$ |
| SPI+T33 _{UV} | T_{amb} | $67,9 \pm 1,8^a$ | $-1,1 \pm 0,2^b$ | $12,0 \pm 0,6^a$ | $29,9 \pm 0,2^d$ | $4,4 \pm 0,2^a$ |
| | $T > 33^\circ\text{C}$ | $76,7 \pm 0,5^b$ | $-2,2 \pm 0,1^a$ | $11,8 \pm 0,4^a$ | $22,5 \pm 0,5^c$ | $3,6 \pm 0,4^a$ |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey

Los cambios en la coloración con la temperatura también se verificaron observando los espectros de absorción en el visible. En la Figura IV.10 se muestran los espectros de las

películas SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} a temperatura ambiente y a temperaturas por encima y por debajo de 16°C y 33°C respectivamente; y se los compara con los correspondientes a las películas proteicas de soja tratadas o no con UV (SPI y SPI_{UV}) que no presentan ninguna señal en este rango ni modifican su apariencia con la temperatura. Los espectros de las películas impresas sí variaron con la temperatura. En los correspondientes a las películas SPI+T16_{UV}, a temperatura ambiente, donde presentaban una coloración rosada tenue no se observa ninguna señal, pero cuando la temperatura disminuye por debajo de los 16°C, y las películas toman una coloración más rojiza aparece un pico con un máximo a 530 nm. Por su parte, los espectros de SPI+T33_{UV} presentan un pico con un máximo a 580 nm a T_{amb}, cuando las mismas son negras que desaparece al superar los 33°C. Por otra parte, cabe señalar que la impresión con las tintas permitiría obtener envases atractivos para la venta, que podrían actuar como filtros de barrera a la luz.

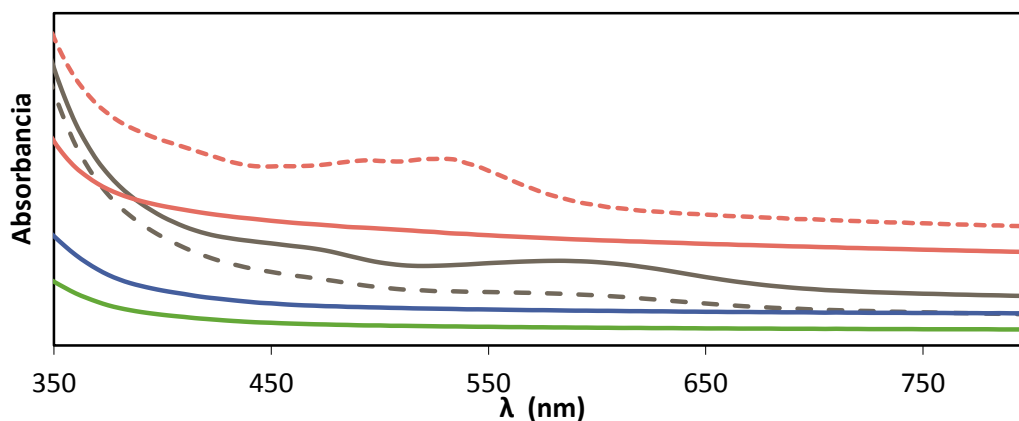


Figura IV.10 Espectros de absorción de luz visible de películas proteicas tratadas o no con UV e impresas con las tintas T16 y T33; a temperatura ambiente: — SPI, — SPI_{UV}, — SPI+T16_{UV} y + SPI+T33_{UV}; por debajo de 16 °C: - - - SPI+T16_{UV} y por encima de 33°C: - - - SPI+T33_{UV}.

Por último en la Figura IV.11 se muestran los termogramas obtenidos por DSC de las películas en estudio -SPI, SPI_{UV}, SPI+T16_{UV}, SPI+T33_{UV}- y en la Tabla IV.9 los parámetros que describen las endotermas encontradas. Las películas proteicas de soja, tratadas o no con UV, no presentaron las típicas endotermas de desnaturalización de β-conglicinina (7S) y glicina (11S) a 113°C y 137°C respectivamente en sus termogramas, debido a que las proteínas presentes en el aislado comercial utilizado se encuentran totalmente desnaturalizadas debido al proceso industrial al que fueron sometidas (Denavi y col., 2009). La presencia de las tintas también se verificó con la aparición de una endoterma en los termogramas de las películas SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} con máximos a ≈17°C y 35°C y respectivamente que coinciden con las temperaturas a las cuales las tintas cambian su

coloración y ΔH de 6,2 y 11,8 J/g. Cuando las muestras se enfriaron y volvieron a calentarse (2da. pasada por DSC) la endoterma reapareció a las mismas temperaturas que en la primera pasada, dando indicio de la reversibilidad de las tintas. Pero cabe resaltar que si bien las endotermas observadas son anchas, las respuestas frente a los cambios de temperatura fueron rápidas y precisas con la temperatura.

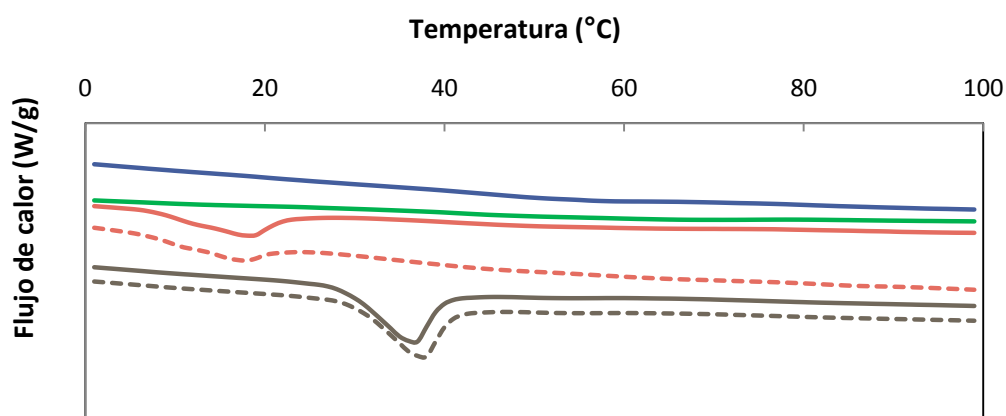


Figura IV.12. Termogramas obtenidos por DSC de películas proteicas tratadas o no con UV e impresas con las tintas T16 y T33. Primera pasada en DSC: — SPI, — SPI_{UV}, — SPI+T16_{UV} y — SPI+T33_{UV} y en segunda pasada en DSC: - - - SPI+T16_{UV} y - - - SPI+T33_{UV}.

Tabla IV.9. Parámetros que caracterizan los termogramas obtenidos en DSC de películas proteicas tratadas o no con UV e impresas con las tintas T16 y T33: SPI, SPI_{UV} SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV}.

| Muestra | T pico (°C) | T inicio (°C) | T fin (°C) | ΔH (J/g) |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| SPI | -- | -- | -- | -- |
| SPI _{UV} | -- | -- | -- | -- |
| SPI+T16 _{UV} | 17,3±0,8 ^a | 6,4±0,4 ^a | 23,5±1,9 ^a | 6,2± 0,5 ^a |
| SPI+T33 _{UV} | 35,6±1,0 ^b | 22,3±1,0 ^b | 44,7±3,1 ^b | 11,8 ±0,9 ^b |

Los valores informados son promedio \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Finalmente la Figura IV.12 sintetiza la respuesta de los materiales SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV} frente a cambios de temperatura. Las aplicaciones más adecuadas para estos materiales podrían asociarse a indicar situaciones de confort, debido a que los cambios de coloración de las tintas termocrómicas empleadas son reversibles.

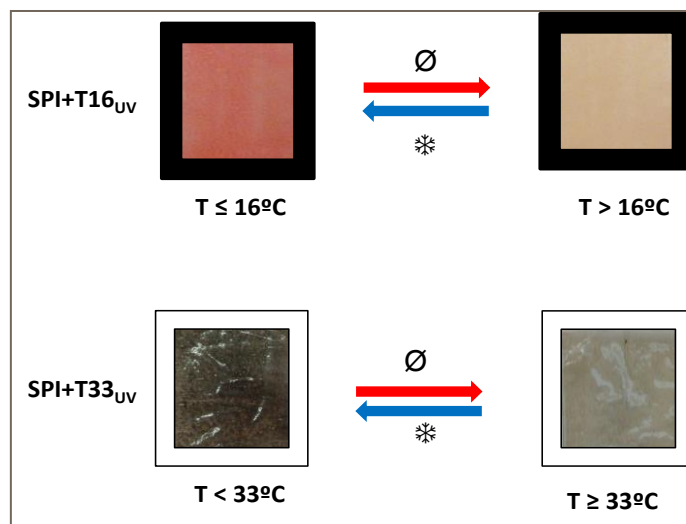


Figura IV.12. Respuesta de las películas proteicas de soja impresas con las tintas termocrómicas T16 y T33 (SPI+T16_{UV} y SPI+T33_{UV}) frente al cambio de temperatura.

IV.4 Conclusiones

El proceso de aplicación de las tintas, que involucraba un tratamiento UV, no fue adecuado para películas de gelatina. Las películas de soja impresas presentaron propiedades físicoquímicas superiores que las de las películas control, por efecto de las tintas y principalmente por efecto del tratamiento UV empleado para su aplicación.

El tratamiento UV utilizado, favoreció el entrecruzamiento proteico, principalmente a través de interacciones puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, y otras interacciones covalentes que no fueron precisadas. Este mayor entrecruzamiento provocó mejoras significativas en la resistencia mecánica de los materiales y una disminución en su susceptibilidad al agua. Las dos tintas utilizadas mostraron distinta afinidad por la matriz proteica, lo que se verificó en algunas diferencias en las propiedades de las películas impresas.

Fue posible obtener materiales proteicos de soja, capaces de indicar cambios de temperatura de manera reversible dada la naturaleza de las tintas empleadas.

Las aplicaciones más adecuadas para estos materiales podrían asociarse a indicar situaciones de confort, debido a que los cambios de coloración de las tintas termocrómicas empleadas son reversibles.

V. Películas de gelatina con actividad antimicrobiana activadas con nanopartículas de plata.

V. Películas de gelatina con actividad antimicrobiana activadas con nanopartículas de plata.

V.1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que aquellos producen (ANMAT). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) estima que el impacto de estas enfermedades en países como Estados Unidos resulta en 76 millones de personas enfermas por año, de las cuales 325.000 deben ser hospitalizadas y 5000 mueren. A partir de esta realidad, y con el fin de disminuir la contaminación de los alimentos, la industria alimentaria está especialmente interesada en el desarrollo de envases antimicrobianos. Estos pueden desempeñar un papel crucial en la mejora de la calidad de los alimentos, prolongando su vida útil y previniendo o retrasando su deterioro.

La acción antimicrobiana en los envases puede alcanzarse liberando el agente activo directamente al alimento o al espacio de cabeza en contacto con el alimento (Vermeiren y col., 1999). Estos compuestos pueden ser de origen orgánico, como ácidos, enzimas, péptidos y polímeros, o inorgánicos como es el caso de las nanopartículas metálicas u óxidos metálicos (Malhotra y col., 2015). Dado que los compuestos antimicrobianos orgánicos son menos estables a altas temperaturas, los inorgánicos resultan especialmente interesantes por soportar condiciones de procesamiento más severas (Metak y Ajaal, 2013; Metak, 2015). Entre las nanopartículas metálicas con propiedades biocidas emergentes más importantes se encuentran las de plata (NPAg), cobre (NPCu), óxido de zinc (NPZnO), de óxido de titanio (NPTiO₂), y óxidos de hierro (Toker y col., 2013). La plata (Ag) es conocida por su actividad antimicrobiana intrínseca desde tiempos antiguos. Históricamente los métodos para prolongar la vida útil de leche o agua implicaban colocar una moneda o cuchara de plata en el fondo del recipiente que las contenía; y los barcos de navegación ya contaban con tanques de agua recubiertos con plata para lograr mantener el agua potable durante más tiempo (Duncan, 2011; Llorens y col, 2012.). Se sabe que el ion plata Ag⁺ es altamente activo, ya que puede unirse a las proteínas tisulares provocando cambios estructurales en la pared celular y la membrana

nuclear de las bacterias que conducen a la distorsión y muerte celular. Además, este ion puede provocar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que también contribuye a la eficacia antimicrobiana (Pal y col., 2007; Agnihotri y col., 2014).

El advenimiento de la nanotecnología abrió nuevas perspectivas para el desarrollo de materiales de envase innovadores que puedan proporcionar soluciones tecnológicas en las etapas de procesamiento para mantener la calidad y frescura de los alimentos, mejorar la trazabilidad y la seguridad del producto, modificar el sabor, textura y consistencia; haciendo frente a muchos requisitos industriales (Bradley y col., 2011). La formulación a escala nanométrica puede cambiar las características físicoquímicas de los materiales en comparación con la forma a microescala de la misma sustancia. La alta relación superficie/masa y la reactividad superficial de las nanopartículas, les proporcionan propiedades importantes y nuevas, tanto desde la perspectiva de nuevas aplicaciones como en términos del nivel de migración en relación con los riesgos potenciales para la salud y el medio ambiente (Sánchez-García y col., 2010).

Las NPAg han atraído mucha atención en aplicaciones biomédicas y en el envasado de alimentos debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas únicas tales como importantes propiedades antimicrobianas contra una amplia gama de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos y virus, y por su estabilidad térmica (Kanmani y Rhim, 2014; Rai y col., 2010; Martínez-Abad y col., 2012). Otra característica que aumenta el interés en el uso de estas nanopartículas es que presentan baja probabilidad del desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos en comparación a los antibióticos (Hajipour y col., 2012). Las NPAg han presentado mejores propiedades antimicrobianas en comparación con la plata metálica gracias a su superficie extremadamente grande que puede proporcionar un mejor contacto con los microorganismos (Toker y col., 2013). Además, presentan baja volatilidad y estabilidad a altas temperaturas (Youssef y Abdel-Aziz, 2015). Existen algunas discusiones sobre el mecanismo de la acción antimicrobiana de las NPAg. Hasta ahora, los mecanismos más aceptados de toxicidad proponen que las NPAg: 1) actúan como un vehículo eficaz de entrega de iones de plata, que son captados por los microorganismos e interrumpen la producción de ATP y la replicación del ADN; 2) pueden provocar la generación de ROS junto a los iones de plata; 3) interactúan directamente con microorganismos dañando sus membranas celulares (Grumezescu, 2017). La Figura V.1 representa estas rutas de interacción entre las NPAg y los microorganismos (Grumezescu, 2017).

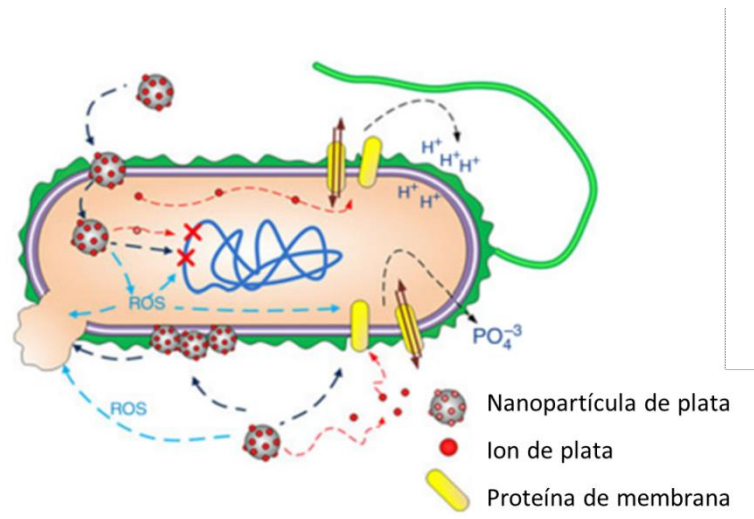


Figura V.1. Diagrama que resume las interacciones entre NPAg y las células bacterianas. Las NPAg pueden i) liberar iones Ag^+ y generar ROS, ii) interactuar con las membranas proteicas e interrumpir sus funciones, iii) acumularse en la membrana de la célula y afectar la permeabilidad de ésta, iv) entrar en la célula, generar compuestos ROS, liberar iones Ag^+ y afectar el ADN. Figura extraída de “Antimicrobial nanocomposites for food packaging” en Food Preservation (Grumezescu, 2017).

Se ha informado que la actividad antimicrobiana de los NPAg depende de la composición, el tamaño, la forma, la funcionalidad química y la carga superficial; y que estos factores están fuertemente influenciados por los métodos de preparación utilizados (Niño-Martínez y col., 2008). Por lo tanto, el diseño adecuado de un método de síntesis mediante el cual se controlan la morfología, el tamaño, la estabilidad, la toxicidad y otras propiedades se ha convertido en un campo de interés principal. Así se han preparado NPAg por reducción química, métodos físicos (ablación láser, calentamiento dieléctrico de microondas, irradiación con ultrasonidos y radiólisis) y a través de rutas biológicas (empleando extractos vegetales, microorganismos y biomoléculas) (Shankar y col., 2014; Shankar y col., 2015).

Tradicionalmente las NPAg se han producido mediante la reducción de nitrato de plata ($AgNO_3$) con agentes reductores químicos tales como borohidruro de sodio, dimetilformamida, trietanolamina e hidracina (Yoksan y Chirachanchai, 2010), que a menudo resultan tóxicos y peligrosos para el medio ambiente, por lo que las nanopartículas resultantes se vuelven inadecuadas para muchas aplicaciones. La selección de un medio acuoso, agentes reductores amigables con el medio ambiente y estabilizantes no tóxicos son los tres factores principales que deben evaluarse para la síntesis verde de

NPAg. Algunos de los métodos ecológicos desarrollados utilizan recursos biológicos, biocompatibles y seguros, tales como extractos vegetales, enzimas, microorganismos y diversos biopolímeros tales como carbohidratos y proteínas (Habbalalu y col., 2013). En particular, algunos aminoácidos como cisteína, tirosina y triptófano han sido analizados como agentes reductores y estabilizantes (agentes “capping”) en la preparación de NPAg con diferentes formas y tamaños (Roy y col., 2012; Selvakannan y col., 2004). Krishnaraj y col. (2010) y Veerasamy y col. (2011) formaron nanopartículas de plata utilizando como agente reductor los extractos de hojas de *Acalypha* y *Garcinia mangostana*. Bankura y col. (2012) prepararon NPAg por reducción de nitrato de plata usando una solución acuosa de dextrano. Por su parte, Zhao y col. (2013) emplearon a los residuos de tirosina presentes en las proteínas de soja como agentes reductores para la obtención de NPAg.

Las NPAg se pueden alojar en diferentes matrices formadas por polímeros y agentes estabilizantes (como citratos y alcoholes de cadena larga) (Toker y col., 2013), a través de diferentes estrategias: pueden ser recubiertas, absorbidas, o incorporadas directamente durante los procesos de síntesis (Martínez- Abad y col., 2012). Más allá de sus propiedades antimicrobianas, la gran área superficial y la estructura cristalina de las NPAg, las convierte en candidatas potenciales para ser utilizadas como nanorefuerzos de materiales poliméricos. Se ha descrito la incorporación de NPAg a materiales poliméricos de distinta naturaleza. Entre los no degradables, el polietileno (PE), el cloruro de polivinilo (PVC) y el poli etilenvinil alcohol (EVOH) han sido los más analizados para envasado de alimentos (Shankar y Rhim, 2015). Mientras que entre los biopolímeros los basados en polisacáridos como almidón, quitosano, celulosa, pululano y alginatos han sido más estudiados que los proteicos (Raghavendra y col., 2016; Abreu y col., 2015; Gao y col., 2011).

Algunos de estos sistemas nanocompuestos han sido probados en sistemas reales, y han demostrado ser efectivos para prolongar la vida útil de alimentos frescos tales como productos cárnicos y lácteos debido a los efectos biocidas contra *E. Coli*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, (Carbone y col., 2016). Por su parte, Martínez-Abad y col. (2012) señalaron que la actividad antimicrobiana de los nanocompuestos puede variar dependiendo del contenido proteico de los alimentos, dado que la inactivación de la plata es favorecida por la presencia de proteínas. En este trabajo se incorporaron iones de plata en una matriz polimérica de EVOH y se probó la eficacia antibacteriana en contacto con diferentes tipos de alimentos. Con muestras de alimentos con bajo contenido de proteínas como fruta fresca cortada, y con alimentos con alto contenido de proteínas como carne y

queso. Los resultados de los experimentos mostraron que en las muestras de alimentos con baja concentración de proteína la inactivación microbiana ocurrió en menor medida. Las preocupaciones sobre la posible toxicidad de las NPAg hicieron que las autoridades de seguridad alimentaria de la Unión Europea y de los Estados Unidos establezcan regulaciones para su uso en envases de alimentos y límites para la migración de Ag^+ a los alimentos envasados (Bouwmeester y col., 2007). Evaluaciones realizadas sobre la migración de Ag^+ desde las NPAg a alimentos envasados en varias condiciones de uso, indican que los alimentos ácidos y que el calentamiento por microondas pueden aumentar la migración aunque la concentración de Ag^+ se mantiene por debajo de los límites de seguridad establecidos (0,05 mg/L en agua y 0,05 mg/kg de comida) (Cushen y col., 2013). Esto implica que las evaluaciones de los perfiles de migración de plata son necesarias para asegurar la efectividad antimicrobiana mientras se cumple con la legislación vigente. La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) publicó en 2011 un documento que indica que los productores requieren pruebas de genotoxicidad, absorción, distribución, metabolismo y excreción *in vitro* (EFSA, 2011). Del mismo modo, en los Estados Unidos la USFDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) publicó en 2014 un documento que proporciona orientación a los productores de ingredientes alimentarios y sustancias de contacto con alimentos, y recomendó el estudio y preparación de un perfil toxicológico para cada envase que tenga nanomateriales en su formulación (USFDA, 2014).

V.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo fue desarrollar películas antimicrobianas de matriz proteica a través de la incorporación de nanopartículas de plata a la formulación, y evaluar el efecto que la presencia de estas nanopartículas produce en las propiedades fisicoquímicas de los materiales resultantes.

Para alcanzarlo se estudiaron dos estrategias:

- i. Sintetizar inicialmente las nanopartículas por reducción con citrato de sodio, y una vez formadas agregarlas a la dispersión filmogénica, o
- ii. Sintetizar las nanopartículas de Ag en la misma dispersión filmogénica, aprovechando el carácter reductor de las proteínas.

Teniendo en cuenta que durante la síntesis de las NPAg hay cierto desarrollo de color, que incluso contribuye a verificar la formación de las nanopartículas, se decidió trabajar con una proteína incolora como es la gelatina. En este sentido Kanmani y col. (2014) señalaron

que el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina -presente en la gelatina en concentraciones de entre 15% y 23% (Gómez-Estaca y col., 2009; Karim y Bhat 2009) ayudaría a la reducción del AgNO_3 . Los aminoácidos no polares como: glicina, prolina, alanina e hidroxiprolina contribuirían a la estabilización de las nanopartículas a través de una estructura particular, estabilizada principalmente por enlaces de hidrógeno intra e inter-molecular, producto de una repetición casi continua de la secuencia de Gly-X-Y, donde X sería principalmente prolina e Y sería sobre todo hidroxiprolina (Asghar y Henrickson, 1982).

V.3. Materiales y métodos

V.3.1 Materiales

Se empleó gelatina comercial (Royal, Kraft Foods, Argentina) como fuente de proteínas, y glicerol (Anedra, Argentina) como plastificante de las películas. Para la síntesis de las nanopartículas de plata se utilizó nitrato de plata (AgNO_3 , Anedra, Argentina) y citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, Anedra, Argentina).

V.3.2 Síntesis de nanopartículas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizador (NPAg_c)

Las nanopartículas de plata se obtuvieron considerando los trabajos de Flores (2014) y Kanmani y col. (2014) con algunas modificaciones. Se solubilizaron 20 ml de una solución de citrato de sodio al 1% p/v y 0,8 ml de una solución de AgNO_3 0,3 M en 80 ml de agua destilada. La dispersión resultante se colocó en un baño de agua a 80°C y se mantuvo con agitación magnética a 300 rpm durante 90 minutos. La síntesis se siguió en el tiempo caracterizando el sistema cada 15 minutos con el fin de verificar la formación de las nanopartículas y determinar el tiempo adecuado del proceso. Al finalizar el calentamiento, las dispersiones se colocaron en baño de hielo para detener la reacción.

V.3.3 Síntesis de nanopartículas de plata en la misma dispersión filmogénica (NPAg_G)

La síntesis de las nanopartículas en estas condiciones se realizó en base a la metodología descrita en la sección anterior. Se analizaron dos concentraciones relativas de nanopartículas. Para una de estas condiciones, que denominaremos Ag_{G1} se solubilizaron 5 g de gelatina en 100 ml de agua a 80°C y se adicionaron 0,8 ml de una solución de AgNO_3 0,3 M; y para la otra, Ag_{G2} se solubilizaron 5 g de gelatina en 80 ml de agua a 80°C y se

adicionaron 20 ml de una solución de AgNO_3 0,3 M. Las dispersiones se mantuvieron en agitación magnética en un baño de agua a 80°C por 90 minutos. A distintos tiempos las muestras se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción y analizar el sistema resultante.

A este proceso nos referimos cuando mencionamos *nanopartículas formadas en la solución filmogénica*, ya que la gelatina utilizada para la reducción y estabilización de las nanopartículas, será la que posteriormente, una vez agregado el glicerol, forme la matriz proteica que constituye la película.

V.3.4 Caracterización de las nanopartículas de plata

Las dispersiones producto de la reacción del AgNO_3 con citrato de sodio o gelatina a distintos tiempos se caracterizaron con el fin de seleccionar las condiciones óptimas para la obtención de nanopartículas que luego se utilizaran para formular las películas nanocompuestas en base a gelatina.

V.3.4.1 Determinación del tamaño de partícula

Se determinó el tamaño de las partículas de plata en las dispersiones mediante la medida de dispersión de luz dinámica (DLS). En esta técnica la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. Por lo tanto, mediante el uso del *software* provisto por el equipo, se puede obtener la distribución de tamaños de partículas presentes en la muestra. Se utilizó un equipo Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra), con un rango de medición de 0,6 – 6000 nm, provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un *correlator* digital, modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente utilizando una celda de poliestireno. Para las dispersiones de nanopartículas formadas con gelatina previamente se filtraron con filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ (Osmonics) de modo de eliminar la posible turbidez que pudiera existir en la muestra. Las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

V.3.4.2 Espectro de absorción UV-visible

Se obtuvieron los espectros de absorción en la región UV-Vis (de 200 a 800 nm) de las dispersiones sin diluir en un lector de placas Biotek, modelo HT Synergy . Las determinaciones se realizaron por duplicado.

V.3.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las dispersiones obtenidas a los distintos tiempos de reacción fueron observadas por un microscopio electrónico de transmisión. Se utilizó el equipo Jeol JEM 1200 EX II del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, operado por el personal técnico a cargo. Las muestras se observaron por tinción negativa. Esta técnica de tinción es sencilla y económica y su uso se ha generalizado para contrastar muestras particuladas. El contraste se obtiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%), que perfila mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro, de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo” o de “tinción negativa”. Se trabajó con grillas cubiertas por una membrana plástica, para evitar que la muestra líquida se escurriera entre los agujeros de la grilla. Los electrones atraviesan la muestra, se dispersan al pasar a través de ella y se enfocan con un objetivo para luego amplificarse en un lente y construir una imagen del objeto.

V.3.5 Formación de las películas de gelatina con NPAg formadas con citrato de sodio

Las películas se obtuvieron por *casting* a partir de dispersiones acuosas que contenían gelatina y nanopartículas obtenidas con citrato de sodio (Sección V.3.2). Brevemente, se dispersaron 5 g de gelatina y 1,25 g de glicerol en 50, 75 y 100 ml de la dispersión NPAg_c preparada con AgNO₃ y citrato de sodio -durante 60 minutos a 80°C-, agitando a 300 rpm durante 10 minutos a 80°C. Posteriormente se agregó agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 100 ml, se ajustó el pH en 6 y se continuó con la agitación durante 15 minutos adicionales en el mismo baño de agua a 80°C.

Un volumen de 10 ml de cada dispersión filmogénica se colocó sobre placas Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron en una estufa con circulación forzada de aire (Yamato, DKN600, EE.UU.) a 60°C durante 3 h. Las películas resultantes se acondicionaron 48 h a 20°C y 58% de humedad relativa (en desecadores con soluciones saturadas de NaBr) antes de ser removidas de las placas para su caracterización.

Como control se obtuvieron películas sin nanopartículas de plata de igual manera a partir de dispersiones filmogénicas preparadas dispersando la gelatina y el glicerol en 100 ml de agua destilada a pH 6. Todos los estudios se realizaron al menos con dos tandas de películas formadas independientemente.

V.3.6 Formación de las películas de gelatina con NPAg formadas en la misma dispersión filmogénica

En este caso la formación de las dispersiones filmogénicas se completó con el agregado de glicerol (25 % p/p respecto de la cantidad de gelatina) a las dispersiones formadas a partir de AgNO₃ y gelatina durante 60 minutos a 80°C (Sección V.3.3) y se ajustó el pH en 6. La formación de las películas se completó de igual manera como se describió en la sección anterior. Estas películas fueron comparadas con un control en el que la dispersión acuosa de gelatina fue previamente tratada 60 minutos a 80°C.

En la Tabla V.1 se presenta la nomenclatura de las películas y la formulación de las dispersiones filmogénicas. La diferenciación entre G y G* es para señalar que en las muestras con el asterisco la gelatina fue sometida al tratamiento térmico de 60 minutos a 80°C utilizado para la formación de las nanopartículas en la solución filmogénica.

Tabla V.1. Nomenclatura de las películas obtenidas con nanopartículas de plata y formulación de sus dispersiones filmogénicas.

| Película | Solvente (%v/v) | Concentración de gelatina (%p/v) | Concentración de glicerol (% p/p respecto de gelatina) |
|--------------------------------|-----------------|----------------------------------|--|
| | Agua | Dispersión de nanopartículas | |
| G | 100 | - | 5 |
| G + NPAg_c | 50 | 50 de NPAg _c | 5 |
| G + 1,5NPAg_c | 25 | 75 de NPAg _c | 5 |
| G + 2NPAg_c | - | 100 de NPAg _c | 5 |
| G* | 100 | - | 5 |
| G*+ NPAg_{G1} | - | 100 de NPAg _{G1} | 5 |
| G*+ NPAg_{G2} | - | 100 de NPAg _{G2} | 5 |

V.3.7 Caracterización de las películas de gelatina aditivadas con NPAg

Las películas proteicas fueron caracterizadas según su espesor, color, espectro de absorción UV-visible, contenido de agua, solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas en tracción tal cual se describió en la Sección III.1.2.3. Además se analizó la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas como se detalla a continuación.

V.3.8 Capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de plata y de las películas activadas

La actividad antimicrobiana de las dispersiones preparadas con AgNO_3 y citrato de sodio o gelatina y de las películas proteicas activas se determinó en medio líquido contra *Escherichia Coli*, un bacilo Gram negativo de la familia de las enterobacterias de gran importancia para la salud. La cepa utilizada pertenece a la Colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Los ensayos se realizaron en botellas estériles conteniendo 15 ml de medio mínimo LB (Luria Bertani) formado sólo por extracto de levadura y triptona (Britania, Argentina, 5 y 10 g/L respectivamente), garantizando los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de las colonias, pero sin el agregado de sales adicionales. Se eligió este medio debido a que las NP_{Ag} no resultaron ser estables en los medios de cultivo líquidos ensayados previamente (caldo nutritivo, caldo Mueller Hinton).

Las botellas con medio LB y con 10 μl de cultivo bacteriano se incubaron 9 h a 37°C con agitación para obtener un recuento de 10^8 unidades formadoras de colonias por ml (calculada según la densidad óptica a 600 nm, $\text{DO}=0,5$ a 37°C). En las mismas se colocaron 10 μl de las dispersiones que contenían partículas de plata y discos de películas de 1 cm de diámetro, previamente expuestos por 10 minutos a la luz ultravioleta como medio de esterilización.

Se determinó el crecimiento microbiano como la DO a 600 nm luego de las 9 horas de incubación. Se calculó la actividad antimicrobiana obteniendo la relación entre la DO obtenida para cada muestra y la DO obtenida del crecimiento microbiano sin presencia de otro agente (obteniendo el máximo crecimiento). Como controles se obtuvieron los valores del crecimiento microbiano con muestras sin nanopartículas (dispersión o películas de gelatina) y muestras con un antibiótico de amplio espectro, ampicilina (5 μl) (Sigma, Argentina). Como blanco de reacción se utilizó medio LB. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

V.3.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza y se empleó el test de Tukey para la comparación de medias, con $\alpha=0,05$, empleando Statgraphics Plus (versión 5.1, Statgraphics, USA).

V.4 Resultados y discusión

V.4.1 Selección de las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata obtenidas por reducción con citrato de sodio

En la Figura V.2 se muestra la apariencia de las dispersiones inicial y resultantes de la reacción de AgNO_3 con citrato de sodio a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos de reacción. Inicialmente las dispersiones son transparentes e incoloras, pero al avanzar el tiempo de reacción comenzó a desarrollarse una coloración amarillenta, que a tiempos más largos pareciera perder intensidad y volverse más oscuras, comenzándose a apreciar la aparición de partículas negras en suspensión. El desarrollo de coloración es indicativo de la formación de nanopartículas de plata, de manera que los iones $\text{Ag} (\text{Ag}^+)$ se reducen a NP Ag metálicas (Ag^0). En las condiciones de trabajo utilizadas la coloración amarilla comenzó a observarse a los 45 minutos de reacción, se intensificó hasta los 75 minutos, pero ya a los 90 se atenuó y oscureció. Rhim y col. (2013) también informaron coloración amarillenta verdosa para dispersiones NP Ag formuladas con citrato de sodio, así como otros autores lo han hecho al trabajar con otros agentes reductores y estabilizantes (Shankar y col., 2016; Vinod y col., 2011; Darroudi y col., 2011). El color de las dispersiones de nanopartículas depende del tamaño y de la forma de las partículas ya que estas características determinan la longitud de onda de la luz que pueden dispersar y transmitir; mientras que la intensidad del color depende principalmente de su concentración (Flores, 2014).

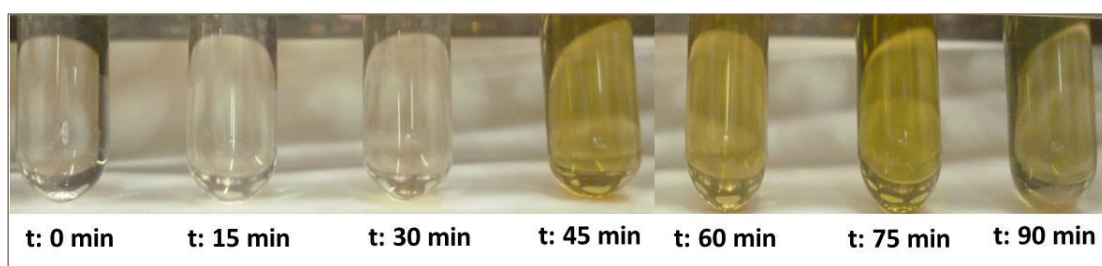


Figura V.2. Apariencia de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO_3 con citrato de sodio a los 0 (inicial), 15, 30, 45, 60 y 90 minutos de reacción.

Las imágenes de las dispersiones se correlacionaron con sus respectivos espectros UV-visibles mostrados en la Figura V.3. Hasta los 30 minutos de reacción no se observó señal en la porción del espectro visible, pero a partir de los 45 minutos apareció un pico de absorción con máximo a 425 nm, que a los 60 minutos de reacción alcanzó su valor

máximo de absorbancia con un corrimiento del pico a 430 nm. A partir de los 75 minutos de la reacción, la intensidad disminuyó pero la longitud de onda del pico se mantuvo. Las propiedades ópticas de algunas nanopartículas metálicas (Ag, Au y Cu) se deben a las oscilaciones de los electrones de conducción del metal, que al ser excitados por la radiación electromagnética generan un efecto denominado resonancia plasmónica de superficie (SPR) (Willets y col.; 2014; Eustis y col., 2006). Las NPAg presentan una intensidad de la banda de SPR alta, por lo que desarrollaron una coloración importante aún a bajas concentraciones. Numerosos autores han descrito esta característica de las propiedades ópticas causadas por la localización sobre la transición del plasmón de resonancia superficial que depende de la morfología de las nanopartículas (El-Changhaby y Ahmad, 2011). En general se han observado estos plasmones en el intervalo de 400 a 450 nm. Shankar y col. (2016) también observaron un desplazamiento del máximo de absorción acompañado de un aumento en la intensidad y en el tiempo de reducción, que atribuyeron al efecto plasmónico superficial de las NPAg. Es sabido que el ensanchamiento y el desplazamiento del pico dependen de la morfología de las nanopartículas, así como de los distintos agentes de reducción y estabilización utilizados. También se ha sugerido que el corrimiento hacia el rojo en el espectro podría deberse al crecimiento del tamaño de NPAg con el tiempo (Abdullah y col., 2015).

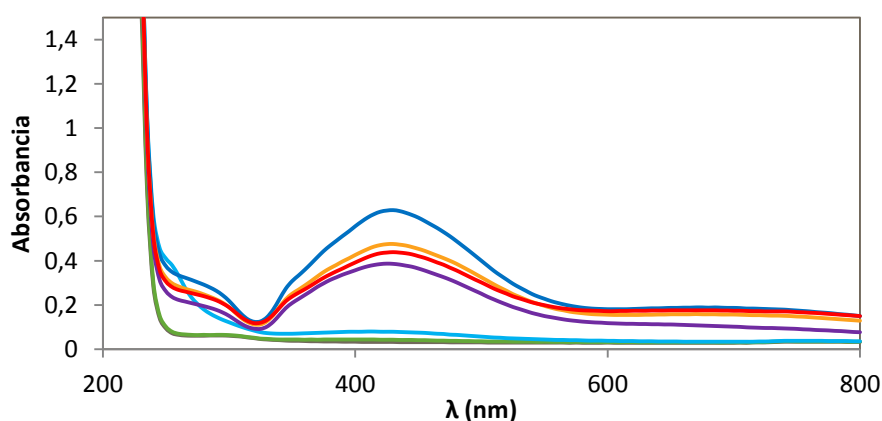


Figura V.3. Espectros de absorción en el UV-visible de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO₃ con citrato de sodio a los: – 0 (inicial), – 15, – 30, – 45, – 60, – 75, y – 90 min de reacción.

En la Figura V.4 se muestra la distribución de tamaños de las partículas de plata obtenidas por reducción usando citrato de sodio como reductor y estabilizante a 0, 60 y 90 minutos

de reacción evaluados por DLS. Al inicio de la reacción las partículas registradas presentaron una distribución de tamaños unimodal con un máximo a 500 nm. Durante el transcurso de la reacción, se fueron formando las nanopartículas de plata. Así, a los 60 minutos de reacción, donde se había encontrado el máximo de absorción a $\lambda=430$ nm en los espectros UV-visible, se observó una distribución unimodal con un máximo correspondiente a NPAg de 8,7 nm. Con el avance de la reacción pareciera que estas nanopartículas tendieran a aglomerarse o a agregarse dado que en el espectro correspondiente a los 90 minutos se observa un pico más ancho, de menor intensidad con un máximo a ≈ 122 nm y con un hombro de baja intensidad a ≈ 21 nm. Similares resultados fueron encontrados por Vinod y col. (2011) con NPAg obtenidas empleando como agente reductor una dispersión acuosa de una goma extraída de un árbol (*Cochlospermum gossypium*) proveniente de India.

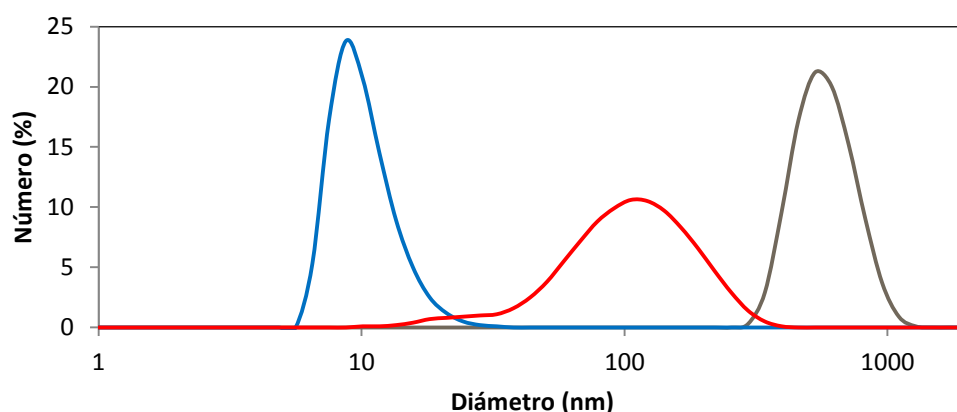


Figura V.4. Distribución de tamaños de partícula obtenidos por dispersión de luz dinámica (DLS) de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO_3 con citrato de sodio a distintos tiempos: — 0, — 60 y — 90 min de reacción.

En la Figura V.5 se muestran las microscopías electrónica de transmisión de las dispersiones estudiadas. Al inicio de la reacción se observaron pocas partículas de plata (partículas en color negro) y sin una forma definida. Cuando el tiempo de reacción transcurre se observa mayor cantidad de estas partículas pero de menor tamaño, a los 15 minutos puede apreciarse este efecto. Entre los 30 y 60 minutos puede observarse cómo el tamaño de las partículas disminuyó y fue aumentando la concentración de las mismas, observándose una máxima concentración a los 60 minutos de reacción, en coincidencia

con las coloraciones de las dispersiones y la máxima absorbancia observada en el espectro visible. También de las imágenes es posible apreciar que las nanopartículas son esféricas. Cuando el tiempo de reacción llegó a los 75 y 90 minutos, las imágenes permitieron visualizar la formación de agregados de nanopartículas de Ag, en coincidencia con el corrimiento hacia mayores tamaños de partículas y la disminución del pico de absorbancia en el visible obtenido para estas dispersiones. Las fotografías son similares a las publicadas por Vinod y col. (2011) y a las que presentaron Gade y col. (2014) durante la obtención de NPAg sintetizadas a través de hongos.

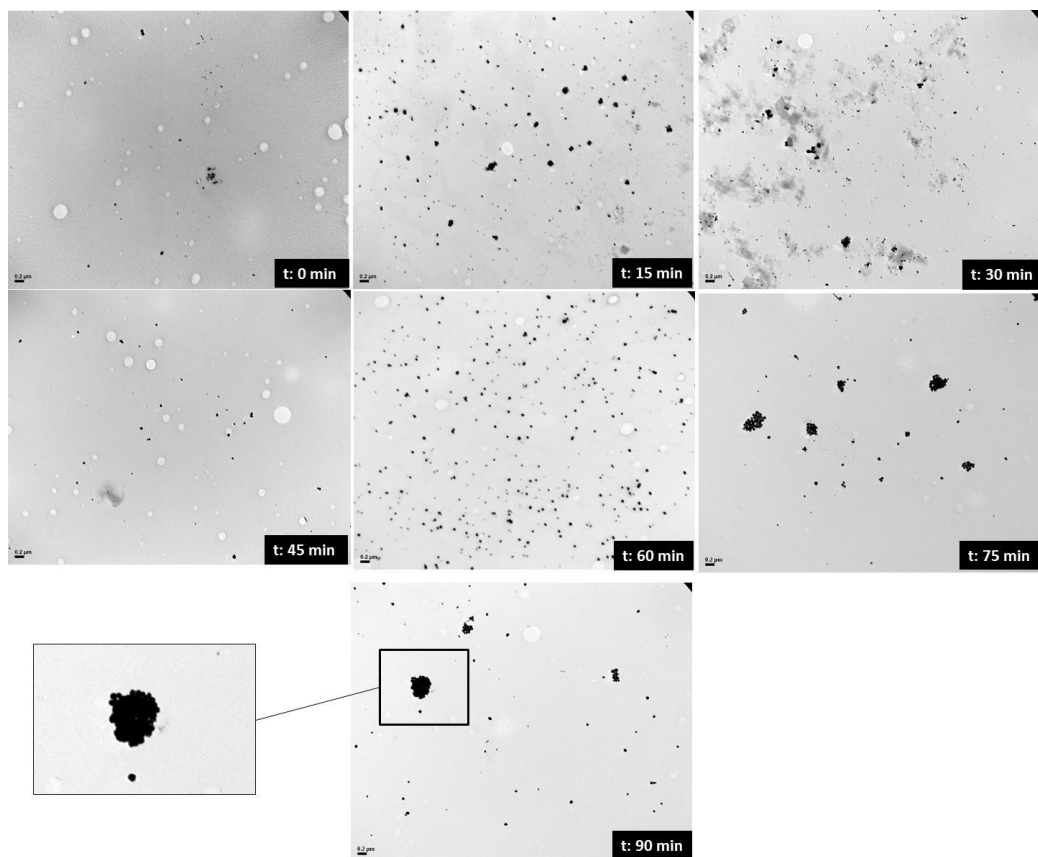


Figura V.5. Microscopía Electrónica de Transmisión de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO_3 con citrato de sodio a distintos tiempos de reacción.

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento (Figura V.6.A). La nucleación, que requiere una alta energía de activación, comienza con la reducción de la sal metálica mediante el reductor adecuado para obtener átomos de metal con un estado

de oxidación igual cero. Los átomos metálicos pueden colisionar con iones metálicos o aglomerados de átomos y formar un núcleo metálico denominado semilla. El crecimiento de estos núcleos ocurre por la difusión y la transferencia de masa de los iones metálicos o átomos metálicos presentes en la solución hacia la superficie de dichos núcleos (Flores, 2014). El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.) (Kahn y col., 2009). Por último, la estabilidad de las dispersiones coloidales depende de la presencia de un agente estabilizante, el cual recubre la superficie de las nanopartículas, evitando su aglomeración por interacciones electrostáticas o por factores estéricos (Figura V.6.B). En el caso del citrato de sodio, utilizado en este trabajo como reductor y estabilizante, la estabilización electrostática implica la repulsión culómbica entre partículas causada por la doble capa eléctrica formada por los iones adsorbidos en la superficie de las nanopartículas (Flores, 2014).

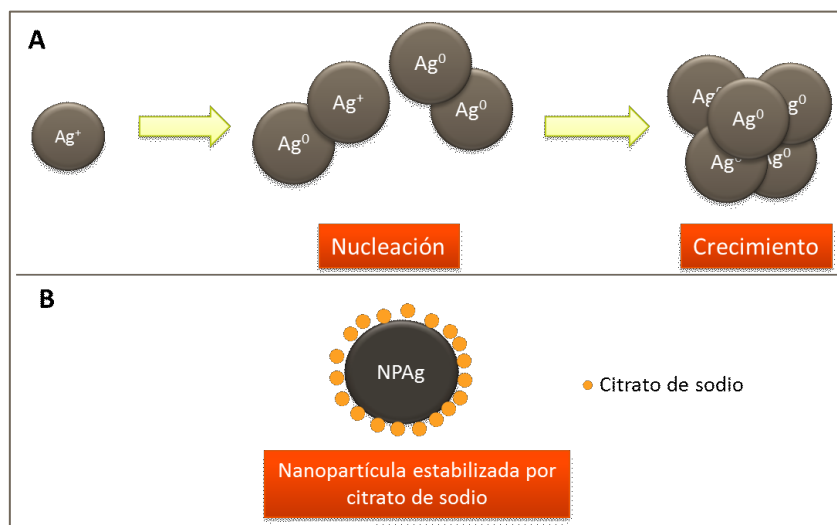


Figura V.6. Esquemas de **A.** formación de las nanopartículas de plata y **B.** de su estabilización en solución.

Por último, se analizó el efecto que el tamaño de las nanopartículas tenía respecto a la inhibición del crecimiento microbiano, analizando la actividad antimicrobiana de las dispersiones estudiadas frente a *E. coli*. Los resultados se presentan en la Figura V.7 y se comparan con la respuesta de ampicilina (control antibiótico). Todas las muestras

presentaron altos grados de inhibición del crecimiento de *E. coli*, mayores al 85%, pero la mayor actividad la mostraron las dispersiones de nanopartículas de plata preparadas con un tiempo de reacción de 60 minutos a 80°C. Algunos autores hacen referencia a este comportamiento indicando que el tamaño de las NPAg influye en la actividad antimicrobiana en algunos casos (Agnihotri y col., 2014).

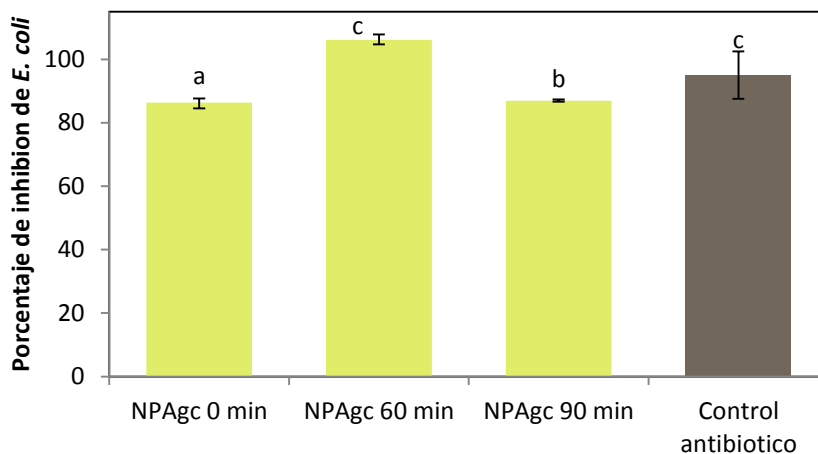


Figura V.7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. Coli* de las dispersiones preparadas a partir de AgNO_3 y citrato de sodio durante 0, 60 y 90 min de reacción y de una dispersión conteniendo ampicilina (control antibiótico).

A partir del análisis realizado, se seleccionó la dispersión preparada a partir de AgNO_3 y citrato de sodio tratada 60 minutos a 80 °C como para ser considerada como fuente de nanopartículas de plata para activar a películas de gelatina. A esa dispersión la llamaremos NPAg.

V.4.2 Selección de las condiciones de síntesis de nanopartículas de plata en la dispersión filmogénica.

Antes de empezar a discutir los resultados de estos estudios, cabe resaltar que si bien nos referimos al medio de reacción como dispersiones filmogénicas, las dispersiones que se analizan en esta sección no contienen el plastificante requerido para la formación de las películas.

En la Figura V.8 se muestra la apariencia de las dispersiones inicial y resultante de la reacción de AgNO_3 con gelatina a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, para las dos concentraciones relativas de sal y proteína estudiadas Ag_{G1} y Ag_{G2} . En concordancia a lo observado anteriormente, inicialmente las dispersiones son incoloras, pero al avanzar el tiempo de reacción comenzó a desarrollarse la coloración amarillenta indicativa de la

formación de nanopartículas. Para ambas concentraciones, la coloración se hizo notar a los 60 minutos de reacción y se conservó a tiempos mayores, siendo significativamente más intensa y algo más anaranjada para las muestras que inicialmente contenían mayor concentración de AgNO_3 . Sólo para esta muestra (Ag_{G2}) la coloración parece intensificarse con el tiempo de reacción. También a simple vista se observó para ambas concentraciones una mayor opacidad de las dispersiones respecto de las muestras tratadas con citrato de sodio, a todos los tiempos de reacción incluso a tiempos cortos donde el desarrollo de color no se manifestó. Esto puede atribuirse a la presencia de la sal y la proteína en conjunto ya que las dispersiones de gelatina son incoloras y su solubilidad esta favorecida por la temperatura, y la sal en la solución acuosa no mostró tal opacidad en la sección anterior.

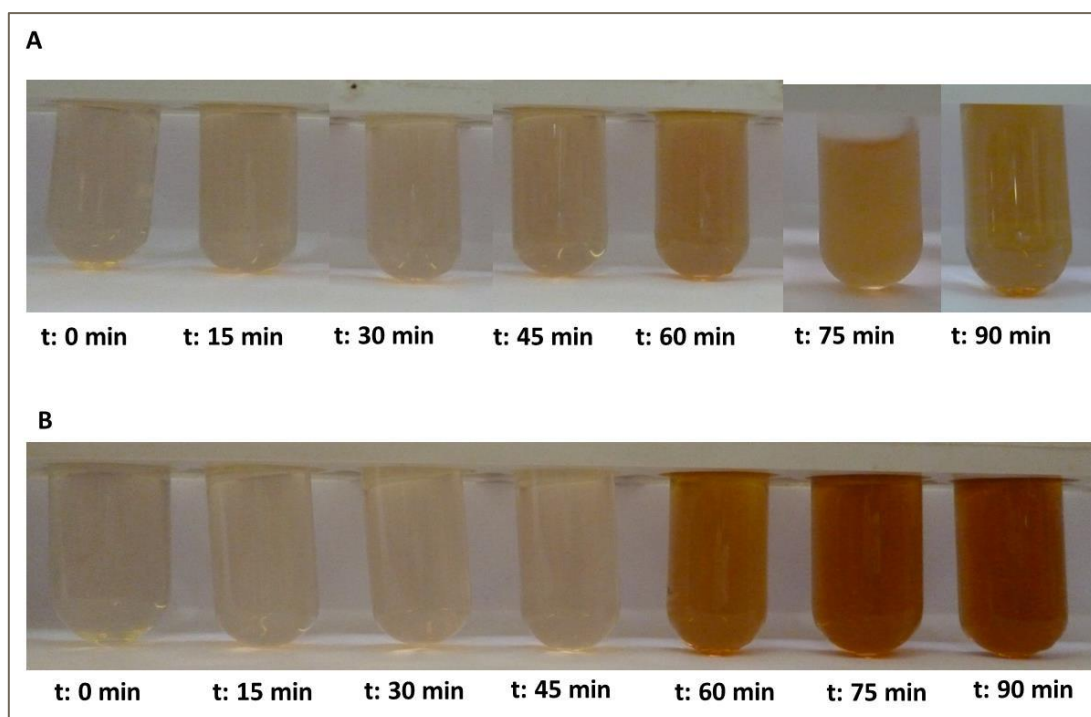


Figura V.8. Apariencia de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO_3 con gelatina a los 0 (inicial), 15, 30, 45, 60 y 90 minutos de reacción para A. Ag_{G1} y B. Ag_{G2} .

En la Figura V.9 se presentan los espectros UV-visible de las distintas dispersiones analizadas, que varían respecto a los observados en la sección anterior debido a la presencia de gelatina en la formulación. En todos los espectros se observa un pico de absorbancia muy marcado con máximo alrededor de 280 nm característico de proteínas,

atribuido a los residuos hidrófobos de tirosina y triptófano (Denavi y col., 2009; Shankar y col., 2015; Raju y col. 2014) y una línea de base más elevada en todo el rango del espectro analizado que podría atribuirse a la opacidad de estas muestras.

En el caso de las muestras Ag_{G1} (Figura V.9 A) sólo se observó claramente la banda asignada al plasmón superficial de las NPAg con su máximo de absorción en 430 nm en las muestras que reaccionaron durante 60 minutos. Pero en el caso de la muestra Ag_{G2} (Figura V.9 B) el desarrollo de los espectros con el tiempo de reacción varía. A todos los tiempos fue posible observar el pico entre 430 y 460 nm, que aumenta en intensidad hasta alcanzar su máximo de absorción a 430 nm a los 60 minutos de reacción. Entre los 15 y 60 minutos, los máximos de los picos se corren desde 460 hasta los 430 nm, y a tiempos más largos los $\lambda_{m\acute{a}x.}$ aumentan nuevamente (Tabla V.2). Las diferencias observadas en los espectros correspondientes a las dos formulaciones deberían atribuirse a la mayor concentración relativa de partículas de plata en Ag_{G2} respecto de Ag_{G1} , teniendo en cuenta que la concentración de $AgNO_3$ inicial en la primera es muy superior.

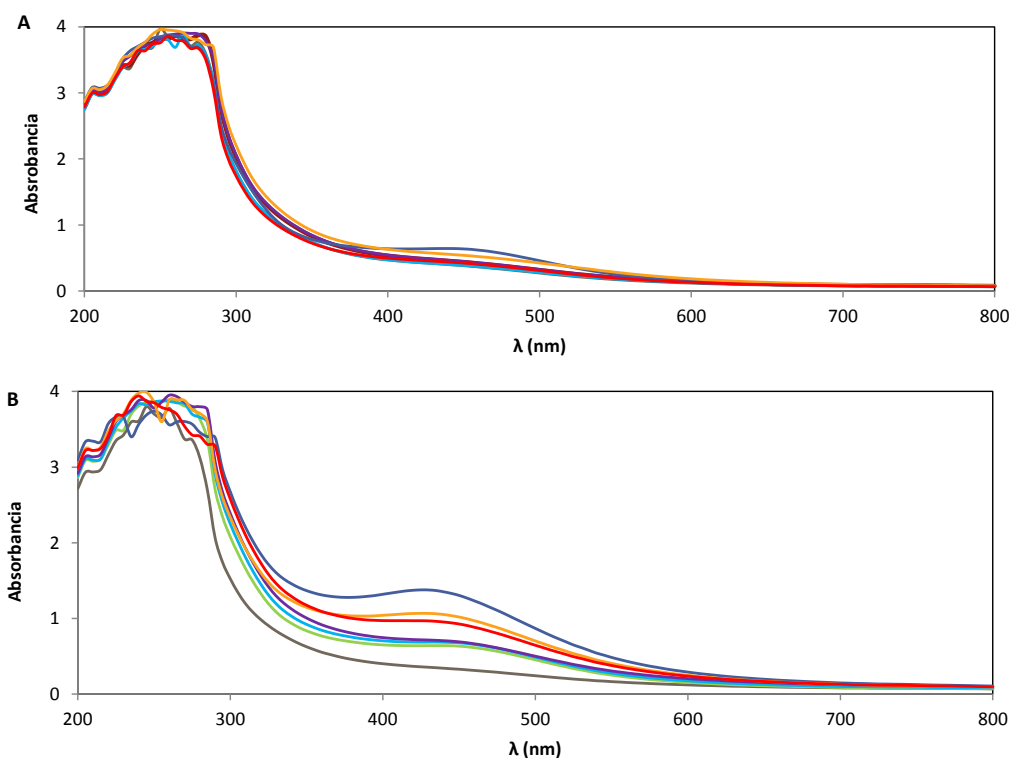


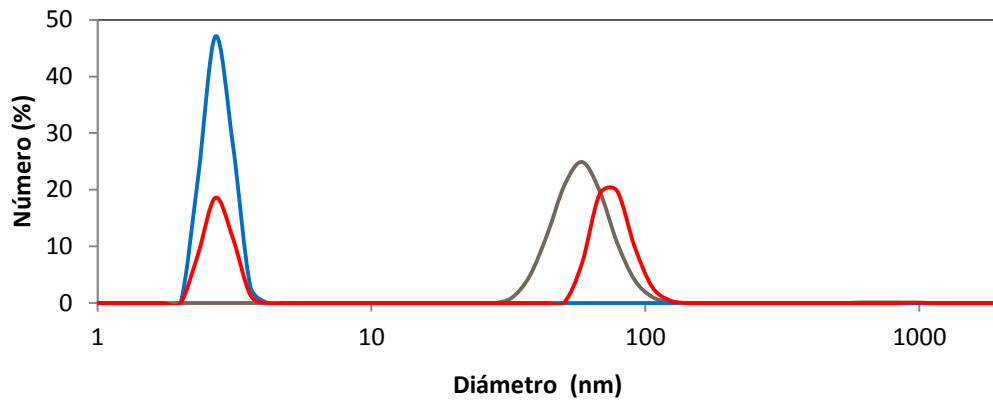
Figura V.9. Espectros de absorción en el UV-visible de las dispersiones resultantes de la reacción de $AgNO_3$ con gelatina a distintos tiempos de reacción: – 0 (inicial), – 15, – 30, – 45, – 60, – 75, y – 90 min de reacción para **A.** Ag_{G1} y **B.** Ag_{G2} .

Tabla V.2. Absorbancia y $\lambda_{\text{máx.}}$ de las bandas correspondientes a los plasmones superficiales de las NPAg obtenidas por reacción de AgNO_3 y gelatina en la concentraciones relativas $\text{Ag}_{\text{G}2}$ a distintos tiempos 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, visualizados en los espectros UV-visibles (Figura V.9 B)

| Tiempo de reacción (min) | $\lambda_{\text{máx.}}$ | Absorbancia |
|--------------------------|-------------------------|-------------|
| 0 | - | - |
| 15 | 460 | 0,63 |
| 30 | 450 | 0,67 |
| 45 | 445 | 0,71 |
| 60 | 430 | 1,37 |
| 75 | 435 | 1,05 |
| 90 | 445 | 0,97 |

En la Figura V.10 se presentan las distribuciones de tamaño de las partículas de Ag presentes en las dispersiones iniciales y a los 60 y 90 minutos de reacción, para ambas formulaciones $\text{Ag}_{\text{G}1}$ y $\text{Ag}_{\text{G}2}$. Cabe resaltar que fue necesario filtrar las muestras para poder analizarlas en el equipo, lo que posiblemente explica porque los picos de las muestras iniciales no coinciden con los de la muestra tratada con citrato. Para la formulación $\text{Ag}_{\text{G}1}$ la dispersión inicial mostró un pico a 58,7 nm en el rango de tamaños analizados. A los 60 minutos de reacción, y según ya se suponía del análisis de los espectros visibles y por el desarrollo de color, se confirmó la aparición de nanopartículas muy pequeñas. El espectro obtenido por DLS muestra un único pico angosto con máximo correspondiente a partículas de 2,7 nm de diámetro, significativamente más pequeñas que las formadas con citrato (de 8,7 nm). Con el transcurso del tiempo de reacción, la concentración de esas nanopartículas pequeñas disminuyó probablemente debido a la agregación de las mismas formando partículas más grandes de aproximadamente 68,6 nm, que si bien siguen siendo nanopartículas tienen diámetros superiores a las que aparecen inicialmente.

A



B

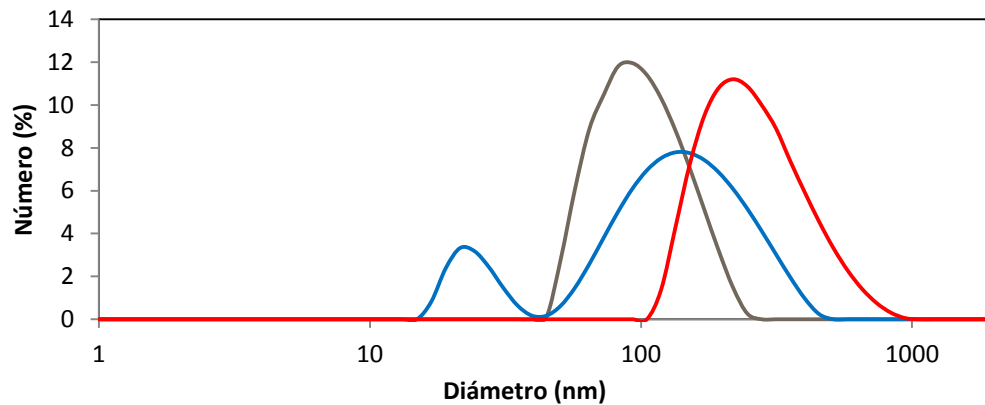


Figura V.10. Distribución de tamaños de partículas obtenidos por dispersión de luz dinámica (DLS) de las dispersiones resultantes de la reacción de AgNO_3 con gelatina a los: —0, —60 y —90 min de reacción para A. Ag_{G1} y B. Ag_{G2} .

Por su parte, la muestra Ag_{G2} inicialmente presentó una distribución unimodal, con un pico ancho con máximo a 93 nm. Cuando el tiempo alcanzó los 60 minutos de reacción, la muestra presentó dos poblaciones de nanopartículas. La primera, menos numerosa y con un máximo correspondiente a diámetros de 21,5 nm; la segunda, más abundante y con un máximo para diámetros de 151,2 nm. Esta muestra es la que registró el inicio del desarrollo de color y mostró la absorbancia máxima a 430 nm. Los mayores tamaños de estas nanopartículas respecto de las obtenidas con la formulación Ag_{G1} podrían ser indicativos de que la cantidad de gelatina no es suficiente para reducir la cantidad de plata adicionada y que si bien se forma una mayor concentración de nanopartículas, estas no alcanzan tamaños tan pequeños. A los 90 minutos de reacción, el perfil vuelve a mostrar un único pico ancho con un máximo correspondiente a diámetros de 218,6 nm, superior a

los tamaños iniciales. Los corrimientos de los bandas correspondientes a los plasmones superficiales de las NPAg observados en los espectros visibles se corresponden con los tamaños de las partículas presentes en las dispersiones si se tiene en cuenta lo reportado por Abdullah y col. (2015), que sugieren que un corrimiento hacia el rojo en el espectro podría deberse al crecimiento del tamaño de NPAg con el tiempo.

En las condiciones del ensayo Ag_{G1}, la gelatina manifestó su poder reductor y permitió obtener NPAg más pequeñas que las producidas empleando citrato de sodio como agente reductor. Mientras que en las condiciones de Ag_{G2}, la gelatina podría encontrarse en defecto respecto a la concentración de AgNO₃ para alcanzar esa situación. Por otra parte, la proteína no pareciera favorecer la estabilización de las NPAg pequeñas ya que se observó una agregación importante luego de su formación en las condiciones de reacción. Para completar este análisis, faltaría estudiar la distribución de tamaños a todos los tiempos de reacción para la muestra Ag_{G2} así como analizar el almacenamiento de las partículas en determinadas condiciones; y especialmente para los 60 minutos de reacción, con el fin de analizar realmente el efecto estabilizante de la proteína.

Los tamaños y la estabilidad de las nanopartículas dependen de la presencia biopolímeros y de otros componentes en la formulación, y de las condiciones experimentales utilizadas en la síntesis. Así a modo ejemplo, Darroudi y col. (2011) lograron preparar NPAg muy pequeñas de 9 y 5 nm en dispersiones con gelatina y glucosa a distintos tiempos de reacción, 6 y 48 h respectivamente a 60°C. El pequeño tamaño de las nanopartículas obtenidas se lo atribuyeron a la estabilización de los grupos amino de la gelatina. Y Ali y col. (2011) prepararon partículas con tamaños superiores, cercanos a los 165 nm de nanopartículas realizadas con quitosano en su formulación.

A diferencia del citrato seguramente la gelatina, de hacerlo, estabilizaría a las nanopartículas por factores estéricos similar al ilustrado en la Figura V.11.



Figura V.11. Esquema de nanopartículas de plata estabilizadas por efectos estéricos

En la Figura V.12 se encuentran las microfotografías observadas por TEM de las dispersiones de gelatina con nanopartículas de plata obtenidas *in situ* a los 60 minutos de

reacción para las distintas concentraciones Ag_{G1} y Ag_{G2} respectivamente. Si bien se logran ver las nanopartículas, fue muy difícil poder observar adecuadamente al sistema en esas condiciones por lo que se procedió también a filtrar las muestras antes de ser analizadas.

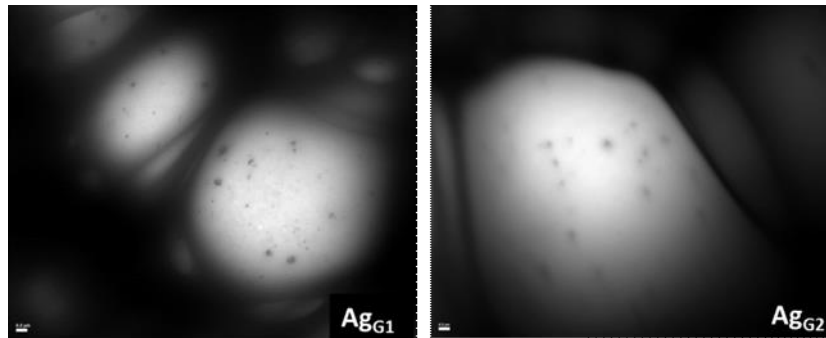


Figura V.12. Microscopía Electrónica de Transmisión de las dispersiones resultantes de la reacción de $AgNO_3$ con gelatina luego de 60 minutos para las formulaciones Ag_{G1} y Ag_{G2} .

En la Figura V.13 se presentan las microscopías de las muestras filtradas a 15, 60 y 75 minutos de reacción. De las imágenes puede verificarse la morfología esférica de las partículas y cierta polidispersidad que en los espectros obtenidos por DLS no se observó para todas las condiciones. La necesidad de filtrar las muestras para ambos estudios puede ser responsable de esta situación. Si bien en la condición Ag_{G2} la concentración de partículas es mucho mayor, según la absorbancia observada en UV, las microscopías (a los 15 minutos por ejemplo) no llegan a mostrar esta situación. Esto podría atribuirse a la filtración y a las diferencias de tamaños de las muestras, ya que para Ag_{G1} las partículas deben ser menos pero más pequeñas. Otra característica interesante que se observó fue la distribución de las partículas en las imágenes para las muestras correspondientes a tiempos de reacción de 60 y 75 minutos. Podría ser que la gelatina luego del tratamiento prolongado a $80^\circ C$ esté agregada formando esas estructuras extrañas vistas en la Figura V.12, en donde las nanopartículas se ubiquen a su alrededor, y al ser filtradas mantengan parte de este dibujo. Si bien esta es una especulación, Chen y col. (2015), por ejemplo encontraron que las NPAg en una dispersión de nanofibras de PVA se localizaban sobre la superficie de las fibras. Más allá de esto, fue posible observar la presencia de nanopartículas muy pequeñas en todas las imágenes, especialmente en la correspondiente

a Ag_{G1} luego de 60 minutos de reacción; y la formación de agregados de nanopartículas a tiempos más prolongados (75 minutos de reacción).

No existen estudios muy completos en donde se analice la estabilización de las nanopartículas de plata con proteínas, aunque sí se han publicado artículos con carbohidratos en su formulación. Cheviron y col. (2015) formaron nanopartículas de plata con almidón y glucosa, la mayor cantidad de glucosa condujo a un menor tamaño de las nanopartículas (< 15 nm) de forma esférica. Bankura y col. (2012) describieron la formación de nanopartículas de plata por reducción de nitrato de plata utilizando una solución acuosa de dextrano como estabilizante.

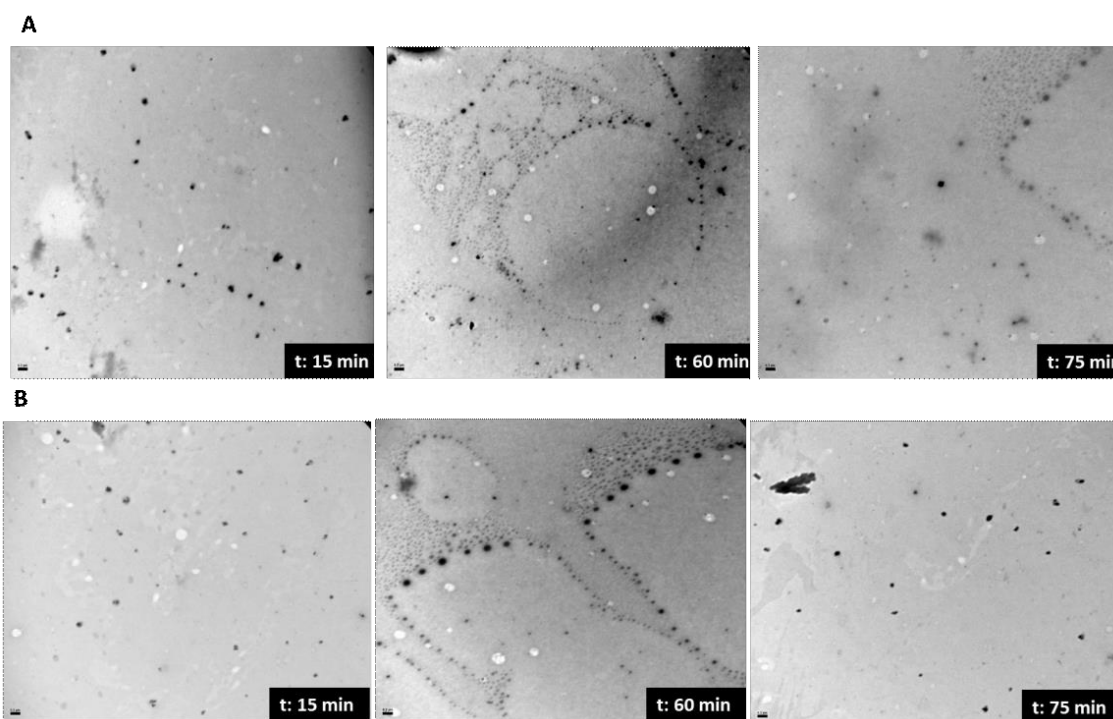


Figura V.13. Microscopía Electrónica de Transmisión de las dispersiones de nanopartículas obtenidas con gelatina **A.** Ag_{G1} y **B.** Ag_{G2^-} filtradas a distintos tiempos de reacción: t: 15min, t: 60 min y t: 75 min.

Más allá de las diferencias observadas en el desarrollo de las partículas de Ag en la dispersión filmogénica dependientes de la condiciones experimentales, todas las dispersiones analizadas presentaron una actividad antimicrobiana alta frente a *E. coli*, superior al 90% no observándose diferencias significativas entre las formulaciones ni los tiempos de reacción, e incluso ni con el antibiótico estudiado (Figura V.14). En base a estos

resultados, este debe ser considerado sólo un ensayo preliminar. Deberíamos probar la respuesta frente a otros microorganismos, para comprobar si con otros microorganismos menos sensibles a la actividad de Ag se pueden llegar a ver los efectos que las nanopartículas tienen respecto al uso directo de AgNO_3 .

Igualmente, Mohan y col. (2016) también indicaron que el tiempo de reacción no tenía ningún efecto significativo sobre la actividad antibacteriana de los NPAg preparadas usando almidón y dextrinas como agentes reductores y estabilizantes, a pesar de los diferentes tamaños de las partículas sintetizadas.

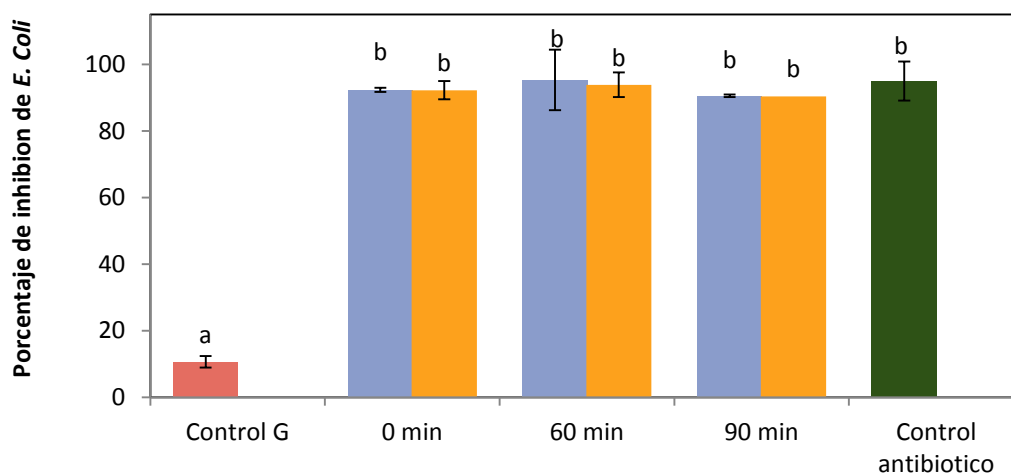


Figura V.14. Actividad antimicrobiana de las distintas nanopartículas obtenidas con gelatina como agente reductor. ■ Ag_{G1} y ■ Ag_{G2} a distintos tiempos de reacción: 0, 60 y 90 min y los controles Gelatina (■) y antibiótico (ampicilina) (■).

A partir de los resultados encontrados, se seleccionaron las dispersiones preparadas a partir de AgNO_3 y gelatina tratadas durante 60 minutos a 80°C como soluciones filmogénicas para la preparación de películas, principalmente por ser las que tenían mayor concentración de nanopartículas (mayor absorbancia en el pico correspondiente al plasmón superficial) de menor tamaño.

V.4.3 Películas de gelatina aditivadas con nanopartículas de plata obtenidas previamente usando citrato de sodio como reductor/estabilizante.

El agregado de distintos volúmenes de la dispersión con nanopartículas de plata obtenidas con citrato de sodio (NPAg_c) a la dispersión filmogénica, permitió obtener películas de gelatina con distinta concentración de nanopartículas. Por las relaciones volumétricas agregadas a las dispersiones filmogénicas, a esas películas las denominamos G+ NPAg_c, G+ 1,5NPAg_c, y G+2NPAg_c. Las películas, obtenidas por *casting*, resultaron homogéneas, flexibles y pudieron removerse fácilmente de las placas. En la Figura V.15 se muestra su apariencia y en la V.16 los parámetros de color L*, a*, b* y ΔE que caracterizan su coloración.

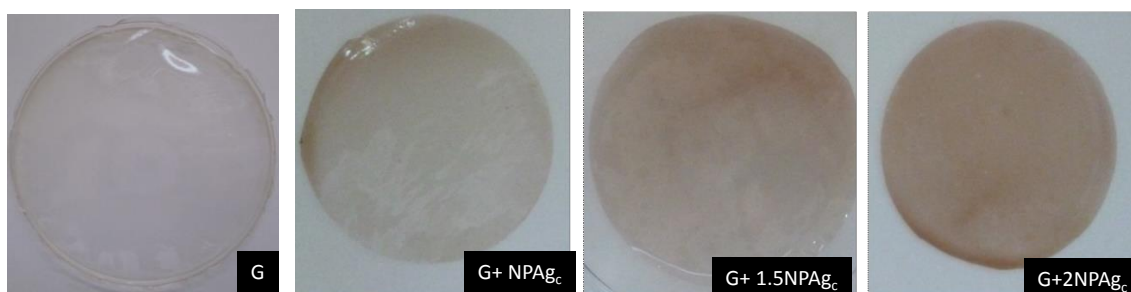


Figura V.15 Apariencia de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAg_c).

Las películas de gelatina control (G) resultaron transparentes e incoloras, con una alta luminosidad (L*) y bajos valores de a*, b* y ΔE*. Con el agregado creciente de NPAg_c, las películas tomaron una coloración amarronada que se incrementó con la concentración de nanopartículas, caracterizada por una disminución progresiva y significativa de su luminosidad, un aumento importante de los parámetros a* y b* (hacia el rojo y amarillo respectivamente) y en consecuencia un incremento en ΔE*. Similares resultados fueron obtenidos al agregar nanopartículas de plata a películas formadas por otros biopolímeros, como agar, pectina y gelatina (Shankar y col., 2015 y 2016; Kanmani y Rhim, 2014).

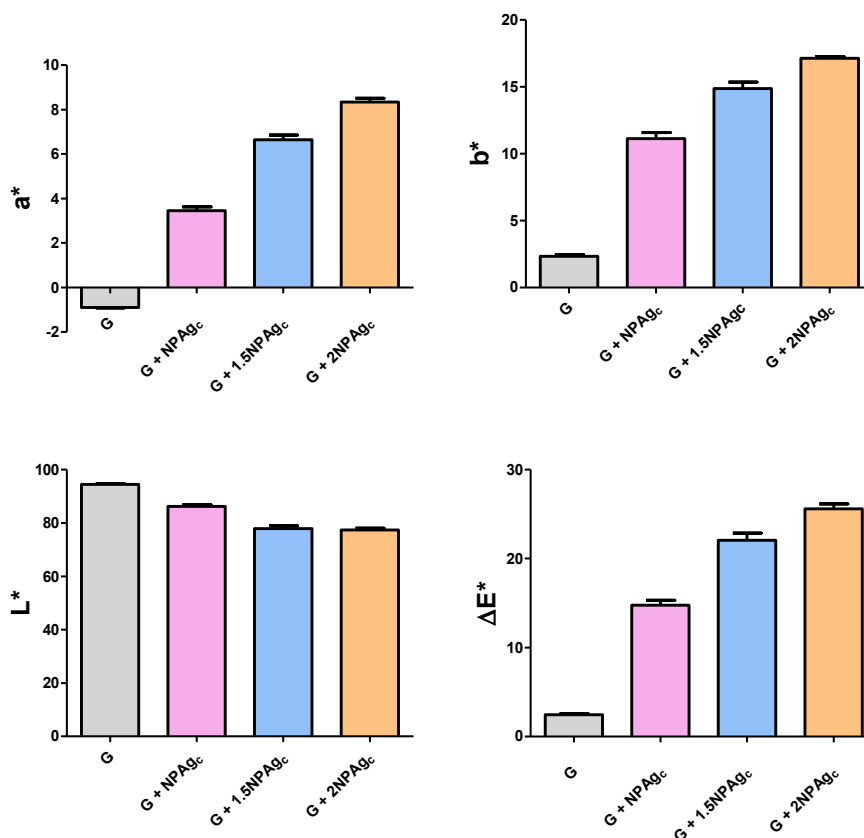


Figura V.16. Parámetros de color en la escala CIE Lab de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAg_C).

En la Figura V.17 se presentan los espectros UV-visible de las películas. En las películas nanocompuestas, aparece un pico ancho cuya absorbancia se intensifica con el aumento de la concentración de nanopartículas a 448 – 500 nm, que podría atribuirse a las características ópticas de las NPAg, pero que aparece corrido respecto de los picos observados para las dispersiones iniciales a 430 nm. Estos resultados hacen suponer que el entorno de las NPAg en la película, luego del proceso de eliminación de solvente, estaría influenciando las propiedades ópticas del sistema. Estos corrimientos, en ambas direcciones fueron reportados por otros autores al trabajar con otras matrices biopoliméricas, como ágar y pectina, indicando que la dirección del corrimiento del pico probablemente depende de la naturaleza del polímero así como de su compatibilidad con las nanopartículas (Shankar y col., 2015 y 2016).

Más allá de la verificación de la presencia de las nanopartículas de plata, los espectros de las películas nanocompuestas presentaron mayores absorbancias en todo el espectro. Esta característica además de explicar la mayor opacidad de estos materiales (que se verificó al observar su apariencia) podría ser beneficiosa para alguna aplicación donde se busque protección frente a la radiación UV-visible.

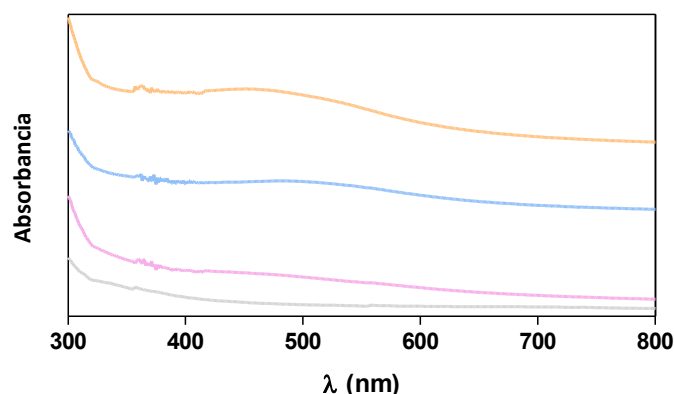


Figura V.17. Espectros de absorción UV-Vis de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata - obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante- (NPAg_c): — G, — G+ NPAg_c, — G+ 1,5NPAg_c, y — G+2NPAg_c.

Tabla V.3. Espesor, contenido de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAg_c).

| Película | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP (.10 ¹¹ g H ₂ O/m.s.Pa) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| G | 51,0 ± 3,0 ^a | 22,1 ± 0,6 ^b | 37,6 ± 2,7 ^a | 7,6 ± 0,8 ^a |
| G+ NPAg_c | 50,8 ± 1,2 ^a | 17,9 ± 0,1 ^a | 54,6 ± 6,0 ^b | 8,9 ± 0,3 ^{ab} |
| G+ 1,5NPAg_c | 60,6 ± 5,6 ^b | 18,2 ± 0,8 ^a | 51,8 ± 2,6 ^b | 10,5 ± 0,7 ^{bc} |
| G+2NPAg_c | 62,0 ± 2,0 ^b | 18,0 ± 0,5 ^a | 48,5 ± 4,4 ^b | 11,8 ± 0,5 ^c |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05) de acuerdo al test de Tukey.

En la Tabla V.3 se muestran el espesor, el contenido de agua, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas y en la Tabla V.4 sus propiedades mecánicas -medidas en tracción-. El agregado de concentraciones crecientes de NPAG_c a las películas de gelatina provocó un pequeño aumento del espesor de las películas, que sólo se percibió para G+1,5NPAG_c y G+2NPAG_c; una disminución en el contenido de agua y un aumento en la solubilidad de las películas, ambos independientes de la concentración de nanopartículas agregadas, y un aumento progresivo de la permeabilidad al vapor de agua.

La presencia de las NPAG_c logró ejercer un efecto refuerzo importante sobre las propiedades mecánicas que se manifestó en un aumento de la tensión a la rotura y del módulo de Young y una disminución en la elongación de las películas proteicas, siendo el efecto más marcado para las películas con menor concentración de nanopartículas agregadas. Esta película (G+ NPAG_c) presentó un aumento de 165% y 267% en su tensión a la rotura y módulo de Young respectivamente y una disminución de 60% en su elongación a la rotura respecto de la película proteica.

Tabla V.4. Tensión a la rotura (σ_r), elongación a la rotura (ϵ_r) y módulo de Young (E) obtenidos con ensayos en tracción de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAG_c).

| Película | σ_r (MPa) | E (MPa) | ϵ_r (%) |
|-------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| G | 3,4 ± 0,3 ^a | 0,15 ± 0,01 ^a | 159,2 ± 5,5 ^c |
| G+ NPAG _c | 5,6 ± 1,4 ^b | 0,4 ± 0,01 ^c | 96,9 ± 9,5 ^a |
| G+ 1,5NPAG _c | 5,7 ± 0,5 ^b | 0,27 ± 0,07 ^b | 118,5 ± 7,3 ^b |
| G+2NPAG _c | 3,7 ± 0,3 ^a | 0,24 ± 0,03 ^b | 109,2 ± 8,5 ^b |


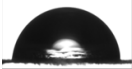
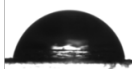
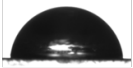
Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b...) en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de acuerdo al test de Tukey.

Aparentemente este efecto refuerzo podría atribuirse al menor contenido de agua que presentaron las películas nanocompuestas -dado que el agua es un fuerte plastificante de las matrices proteicas- y al cambio en el entrecruzamiento de las matrices debido a la presencia de las partículas, por nuevas interacciones proteína-partículas y nuevas y distintas interacciones proteína-proteína, lábiles a la acción del agua, lo que explicaría el aumento en la solubilidad de las películas.

Shankar y col. (2016) observaron efectos similares. Ellos reportaron que a pesar de no haber observado cambios estructurales por FTIR al incorporar NPAg a películas de pectina, las películas resultantes presentaron mayores resistencias térmicas y mecánicas así como mayores permeabilidades al vapor de agua. Por su parte, Kanmani y Rhim (2014), mostraron que la incorporación de NPAg afectó ligeramente las propiedades físicas y mecánicas de películas de gelatina, pero logró disminuir su permeabilidad al vapor de agua.

En la Tabla V.5 se presentan los ángulos de contacto de las películas estudiadas, que dan indicio de su hidrofobicidad superficial, y se muestran las imágenes de las gotas de agua apoyadas sobre las respectivas películas al momento de la medida. El agregado de nanopartículas de plata incrementó notoriamente la hidrofobicidad superficial de las películas de manera creciente con la concentración. Si bien este resultado puede relacionarse con el menor contenido de agua de las películas nanocompuestas, también da idea del cambio en la estructuración de la matriz proteica. El hecho que los grupos más hidrofóbicos se encuentren en la superficie de la película induce a pensar en ciertos cambios conformacionales que conducen a una matriz más hidrófila, lo que también estaría avalado por la mayor solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas nanocompuestas. Por su parte, Rhim y col (2013) también observaron aumentos en los ángulos de contacto al agregar NPAg a películas de agar, mientras que Yoksan y Chirachanchai (2010) observaron el efecto contrario con almidón y quitosano.

Tabla V.5. Ángulo de contacto de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAg_c).

| Película | Angulo de contacto | |
|-------------------------|-------------------------|---|
| G | 57,0± 4,2 ^a |  |
| G+ NPAg _c | 83,1,± 5,4 ^b |  |
| G+ 1,5NPAg _c | 84,2 ±5,8 ^b |  |
| G+2NPAg _c | 94,9± 3,3 ^b |  |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b...) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) de acuerdo al test de Tukey.

Finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de las películas frente a *E. coli*. Los resultados se presentan en la Figura V.18. El agregado de las nanopartículas de plata le otorgó a las películas de gelatina importantes propiedades antimicrobianas. Como se observa en el gráfico obtenido, las muestras control con solo gelatina en su formulación -G- presentaron bajo porcentaje de inhibición de *E. coli*. Si bien el porcentaje de inhibición de los microorganismos aumentó al incrementar la concentración de nanopartículas en la película, las diferencias no llegan a ser significativas, incluso con el control que incluía antibiótico ($p > 0,05$). Lok y col. (2006), a través de un análisis proteómico del modo de acción de nanopartículas de plata de 9,3 nm, concluyeron que las nanopartículas desestabilizan la membrana externa de las bacterias *E. coli*, colapsan el potencial de membrana plasmática y merman el nivel de ATP intracelular de un modo similar al de los iones Ag^+ . También observaron que, mientras que los iones de plata procedentes del $AgNO_3$ producen un efecto bactericida empleando concentraciones a nivel micromolar, las nanopartículas de plata muestran un comportamiento bactericida a concentraciones a nivel nanomolar. Y en un estudio posterior (Lok y col., 2007), mostraron que las nanopartículas de plata con una superficie parcialmente oxidada podrían ser transportadores de iones Ag^+ quimisorbidos en cantidades suficientes como para producir un efecto bactericida, mientras que las nanopartículas de plata sintetizadas bajo atmósfera de nitrógeno no presentaban actividad bactericida. Otros autores también lograron activar películas en base a biopolímeros con importantes propiedades antimicrobianas a través del agregado de nanopartículas de plata (Shankar y col., 2016; Siqueira y col., 2016; Cheviron y col., 2015). La posibilidad de que la activación se logre con bajas concentraciones de NPAg permitirá trabajar por debajo de los límites permitidos, de manera de llegar a poder admitir el uso de estos materiales en sistemas reales.

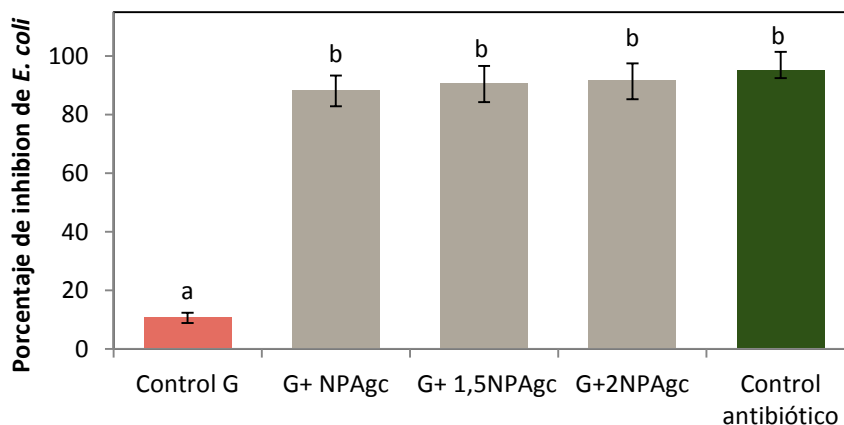


Figura V.18 Actividad antimicrobiana de las películas de gelatina aditivadas con distinto contenido de nanopartículas de plata obtenidas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante (NPAgc) y del control conteniendo antibiótico.

V.4.4 Películas de gelatina aditivadas con nanopartículas de plata formadas *in-situ* en la dispersión filmogénica

Las dispersiones de gelatina tratadas con dos concentraciones de AgNO_3 diferentes, Ag_{G1} y Ag_{G2} (donde la segunda es aproximadamente 25 veces más concentrada en AgNO_3), durante 60 minutos a 80°C , y con el agregado de glicerol se utilizaron como dispersiones filmogénicas para la producción de películas aditivadas con nanopartículas de plata $\text{G}^* + \text{Ag}_{G1}$ y $\text{G}^* + \text{Ag}_{G2}$. Teniendo en cuenta que durante la síntesis de las NPAg la gelatina fue sometida a un calentamiento extenso (60 minutos a 80°C) previo al proceso de formación de las películas, en esta sección se utilizará como película control, una formada de idéntica manera pero sin el agregado de AgNO_3 . Para diferenciarla a esa película se la denominó G^* .

Las películas, obtenidas por *casting*, resultaron homogéneas, flexibles, brillosas, transparentes y pudieron removerse fácilmente de las placas. En la Figura V.19 se muestra su apariencia y en la V.20 los parámetros de color L^* , a^* , b^* y ΔE^* que caracterizan su coloración.

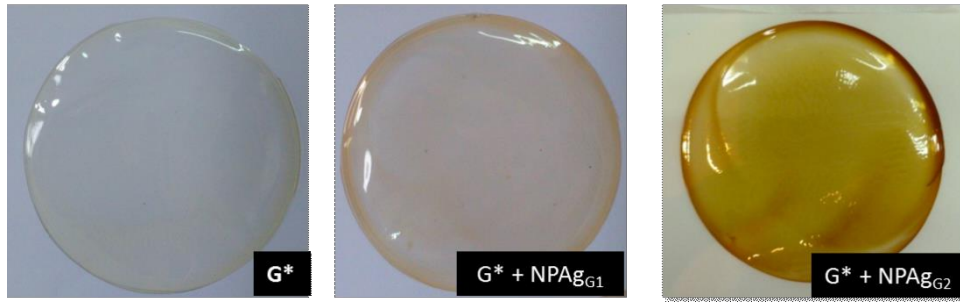


Figura V.19. Apariencia de las películas de gelatina aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica (NPAg_{G1} y NPAg_{G2}).

Las películas de gelatina G*, presentaron una suave tonalidad amarillenta a diferencia de las películas de gelatina G estudiadas previamente en esta tesis que resultaban ser incoloras a simple vista. Estas diferencias se verifican con un incremento en los valores de $-a^*$, $+b^*$ y ΔE , pero sin observarse diferencias importantes en su luminosidad. Este efecto en la coloración en películas proteicas preparadas con dispersiones tratadas térmicamente ha sido reportado por otros autores (Condés y col., 2013; Hoque y col, 2010; Kim y col, 2002) y en parte fue atribuido a productos de la reacción de Maillard.

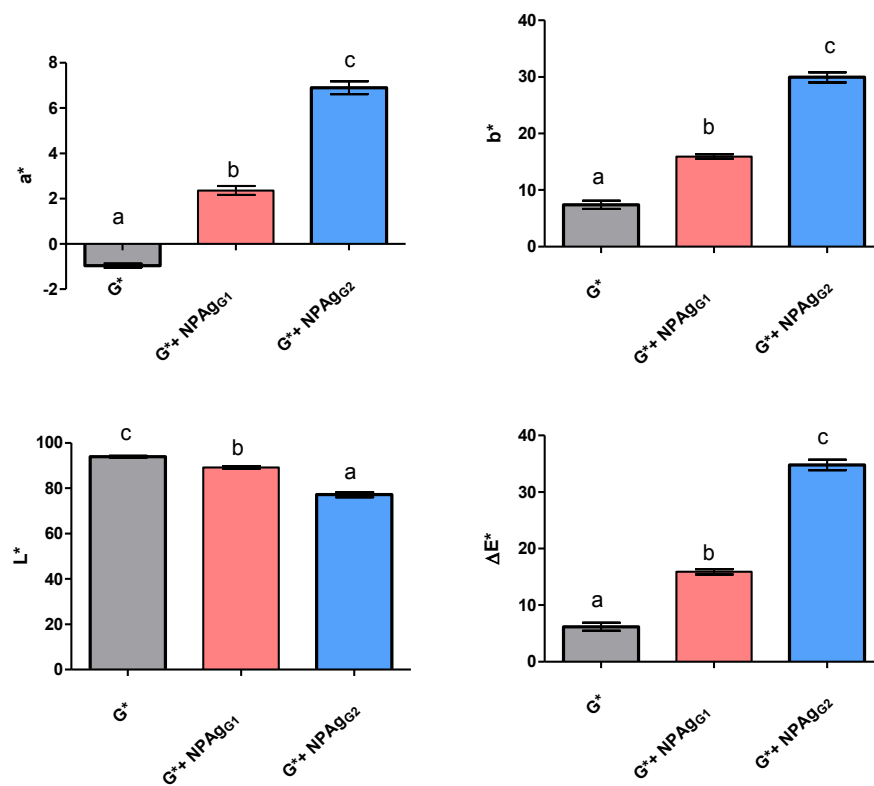


Figura V.19. Parámetros de color en la escala CIE Lab de las películas aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica (NPAg_{G1} y NPAg_{G2})

La presencia de nanopartículas en la formulación hace que las películas resultantes adopten una coloración amarronada-amarillenta (con mayores valores a^* , b^* y ΔE y menor luminosidad L^*) que se intensifica de manera muy marcada al incrementar la concentración de nanopartículas en G^+ NPAg_{G2}, al menos duplicando los parámetros de color pero variando en menor medida L^* . Estos resultados son similares a los encontrados por Rhim y col. (2013) en películas formuladas con agar y NPAg en su formulación.

En Figura V.20 se presentan los espectros de 300 a 800 nm de las películas. No se muestra la primera región del UV, donde aparece la banda característica de las proteínas a 280 nm para poder visualizar mejor el pico característico de las nanopartículas. Ese pico que se atribuye al plasmón superficial de las NPAg sólo se observa claramente para las películas con mayor concentración de partículas G^+ NPAg_{G2} a 450 nm. La banda aparece corrida respecto a la correspondiente a la dispersión inicial que presentaba el máximo de absorbancia a 430 nm, en concordancia con lo discutido en la sección anterior.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kanmani y col. (2014) en películas con formación de nanopartículas de plata *in situ* en la dispersión filmogénica con gelatina, donde también se observa un pico a 450 nm.

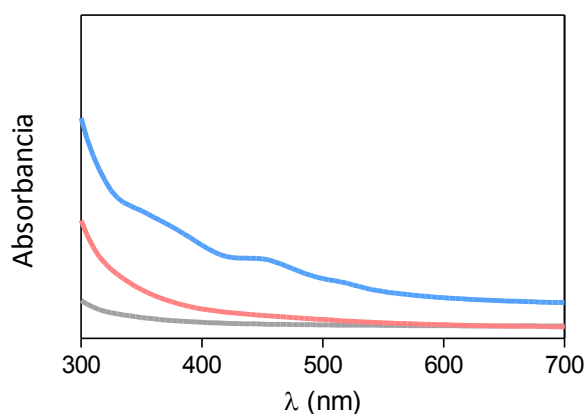


Figura V. 20. Espectros de absorción UV-Vis de las películas aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica (NPAg_{G1} y NPAg_{G2}): — G*, — G*+ NPAg_{G1}, — G*+ NPAg_{G2}

En la Tabla V.6 se muestran el espesor, el contenido de agua, la solubilidad y la permeabilidad al vapor de agua de las películas estudiadas, en la Tabla V.7 sus propiedades mecánicas -medidas en tracción- y en la Tabla V.8 sus ángulos de contacto.

Tabla V.6. Espesor, contenido de agua, solubilidad y permeabilidad al vapor de las películas aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica y su respectivo control (G*, NPAg_{G1} y NPAg_{G2})

| Película | Espesor (μm) | MC (%) | S (%) | WVP (.10 ¹¹ g H ₂ O/m.s.Pa) |
|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| G* | 59,8±5,3 ^b | 19,4±1,7 ^a | 52,1±6,0 ^b | 1,3±0,2 ^a |
| G*+ NPAg _{G1} | 53,5±5,6 ^a | 21,2±0,5 ^a | 62,2±2,3 ^c | 1,2±0,2 ^a |
| G*+ NPAg _{G2} | 59,3±4,2 ^{ab} | 20,8±0,2 ^a | 43,8±0,2 ^a | 1,2 ± 0,06 ^a |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b...) en la misma columna indican diferencias significativas (p <0,05) de acuerdo al test de Tukey.

El calentamiento prolongado al que fue sometida la gelatina provocó cambios estructurales que implicaron la formación de una matriz proteica diferente. Las películas de gelatina G* presentaron mayores espesores que las G antes mostradas. En concordancia a lo observado por Condés y col. (2013), durante la formación de las películas las cadenas peptídicas generaron matrices menos compactas, con menor contenido de agua, pero más solubles, más permeables, con menor resistencia mecánica y mayor hidrofobicidad superficial. A partir de estas propiedades, es posible suponer que el calentamiento prolongado de las proteínas haya podido provocar cierta degradación térmica que no ha sido beneficiosa para su posterior aplicación en la formación de materiales.




La presencia de nanopartículas de plata, formadas en la misma dispersión filmogénica, modificó algunas propiedades funcionales de las películas. Las películas G*+ NPAg_{G1}, con menor contenido de nanopartículas de menor tamaño (2,7 nm), resultaron ser más delgadas, solubles, resistentes y elongables que G*, sin modificar su contenido de agua, permeabilidad al vapor de agua, módulo de *Young* e hidrofobicidad superficial. Mientras que las G*+ NPAg_{G2}, con una concentración de nanopartículas muy superior pero de mayor tamaño y distribución polidispersa, además de modificar la resistencia mecánica y la elongación, lograron también aumentar el módulo elástico y disminuir la solubilidad de las películas, sin modificar de manera significativa el resto de las propiedades.

Tabla V.7. Tensión a la rotura, módulo de *Young*, y elongación a la rotura de las películas aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica y su respectivo control (G*, NPA_{G1} y NPA_{G2})

| Película | σ_r (MPa) | E (MPa) | ϵ_r (%) |
|-----------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| G* | 1,3 ± 0,3 ^a | 0,062 ± 0,006 ^a | 57,9 ± 6,5 ^a |
| G*+ NPA _{G1} | 1,8 ± 0,2 ^b | 0,071 ± 0,01 ^{ab} | 82,0 ± 5,4 ^b |
| G*+ NPA _{G2} | 1,81 ± 0,09 ^b | 0,08 ± 0,01 ^b | 102,5 ± 9,4 ^c |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b...) en la misma columna indican diferencias significativas (p < 0,05) de acuerdo al test de Tukey.

Tabla V.8. Angulo de contacto de las películas aditivadas con nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica y su respectivo control (G*, NPA_{G1} y NPA_{G2})

| Película | Ángulo de contacto |
|-----------------------|--|
| G* | 91,9 ± 2,6 ^b  |
| G*+ NPA _{G1} | 88,9 ± 5,4 ^{ab}  |
| G*+ NPA _{G2} | 86,0 ± 1,4 ^a  |

Los valores informados son promedio ± desviación estándar. Letras diferentes (a, b) indican diferencias significativas (p < 0,05) de acuerdo al test de Tukey.

Por último, la presencia de estas nanopartículas en la formulación permitió activar a las películas con importantes propiedades antimicrobianas, logrando inhibir el crecimiento de *E. coli* casi por completo, tal como se muestra en la Figura V.21. Todas las películas presentaron una actividad inhibitoria importante, sin observarse diferencias entre las distintas muestras. Morones y col. (2005) y Fernández y col. (2009) afirman que el tamaño de las nanopartículas influye en el crecimiento microbiano y que para tener una actividad antimicrobiana óptima el tamaño de las nanopartículas debe ser entre 1-10 nm.

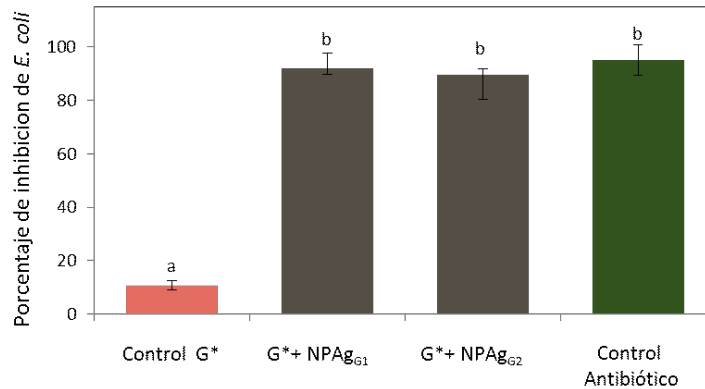


Figura V.21. Porcentaje de inhibición de *E. Coli* de las películas aditivadas con y sin nanopartículas de plata sintetizadas en la dispersión filmogénica (NPAg_{G1} y NPAg_{G2}) y con antibiótico.

Finalmente, cabe resaltar que en todos los casos estudiados el agregado de nanopartículas de plata, sintetizadas con citrato o gelatina como agentes reductores y estabilizadores, lograron inhibir casi completamente el crecimiento de *E. coli*, que fue el microorganismo seleccionado como modelo, y provocar un efecto refuerzo en las películas proteicas (siendo este efecto muy superior en los sistemas donde las nanopartículas se sintetizaron previamente).

V.5. Conclusiones

Con las estrategias analizadas fue posible obtener nanopartículas de plata esféricas, con distintas distribuciones de tamaño y con una importante actividad antimicrobiana evaluada frente a *E. coli*. Estas nanopartículas, al estar presentes en la formulación de películas de gelatina, las activó con importantes propiedades antimicrobianas y lograron ejercer un efecto refuerzo sobre las propiedades mecánicas de los materiales resultantes. Los nanocompuestos preparados agregando nanopartículas previamente formadas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante fueron los que mostraron las mejores propiedades. El tamaño de las nanopartículas de plata pareciera ser más determinante en la actividad antimicrobiana que la concentración.

Muchas de estas conclusiones serán utilizadas como disparadores de hipótesis para poder seguir ahondando en este estudio.

VI. Conclusiones Generales

VI. Conclusiones Generales

- En el transcurso de la Tesis se desarrollaron distintos materiales proteicos activos e inteligentes con propiedades interesantes para ser utilizados como envases de alimentos.
- La gelatina y las proteínas de soja, las dos fuentes de proteínas utilizadas en este trabajo, resultan ser sistemas interesantes para el desarrollo de materiales biodegradables, renovables, activos, inteligentes y nanocompuestos. Su naturaleza y estructura diferentes permiten obtener una amplia gama de materiales con propiedades diferenciales. La selección adecuada de la fuente proteica permite desarrollar materiales nuevos o ampliar la funcionalidad de los existentes para alcanzar aplicaciones distintas y reales.
- Se obtuvieron películas de gelatina aditivadas con distintos indicadores ácido-base, capaces de indicar cambios de pH del medio circundante. Los materiales desarrollados lograron responder cambiando su coloración al ser evaluados frente a medios líquidos, gaseosos y sólidos de distintos pH, simulando el contacto con distintos tipos de alimentos o con el espacio de cabeza del envase.
- Dada la relación directa que existe entre el pH y el crecimiento microbiano, los materiales desarrollados podrían actuar como indicadores de deterioro de alimentos.
- El pescado es un sistema interesante para evaluar estos materiales ya que presenta una variación de pH significativa durante su almacenamiento refrigerado, previo a alcanzar el crecimiento microbiano límite a partir del cual el pescado deja de ser apto para consumo.
- A pesar de sus características anfóteras, las matrices proteicas no interfirieron en el viraje de los indicadores ácido-base en los distintos rangos de pH analizados.
- La afinidad entre el colorante y la matriz es determinante en el diseño del envase o la forma de aplicación del material, especialmente cuando los aditivos utilizados no son de naturaleza comestible.

- La curcumina y las antocianinas son indicadores interesantes para ser utilizados en el desarrollo de materiales inteligentes capaces de indicar cambios de pH, a la par de actuar como materiales activos con importantes propiedades antioxidantes (y en otras condiciones tal vez antimicrobianas).
- La aplicación de estos materiales está estrechamente ligada al rango de viraje del indicador. El análisis de mezclas de indicadores naturales puede resultar en aplicaciones interesantes que deben ser exploradas.
- Se desarrollaron películas proteicas de soja capaces de indicar cambios de temperatura a través de la impresión de los materiales previamente formados con tintas termocrómicas.
- La respuesta de las películas frente a cambios de temperatura resultó ser reversible dada la naturaleza de las tintas termocrómicas empleadas. A partir de esto, las aplicaciones más adecuadas para estos materiales podrían asociarse a indicar situaciones de confort.
- El proceso de aplicación de las tintas, que involucraba un tratamiento UV, no fue adecuado para imprimir películas de gelatina.
- Las películas de soja impresas presentaron propiedades físico químicas superiores que las de las películas proteicas control, por efecto de las tintas, pero principalmente por efecto del tratamiento UV empleado para su aplicación.
- El tratamiento UV utilizado, favoreció el entrecruzamiento proteico, principalmente a través de interacciones puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, y otras interacciones covalentes que no fueron precisadas. Este mayor entrecruzamiento provocó mejoras significativas en la resistencia mecánica de los materiales y una disminución en su susceptibilidad al agua.
- El tratamiento UV se nos presenta como una buena y efectiva estrategia para mejorar las propiedades fisicoquímicas de las películas proteicas.
- Se obtuvieron películas de gelatina con propiedades antimicrobianas muy importantes a través de la presencia de nanopartículas de plata en la formulación.

- Las nanopartículas también ejercieron un efecto refuerzo importante sobre la matriz proteica.
- Las dos estrategias seguidas ya sea formando las nanopartículas con anterioridad o en la misma dispersión filmogénicas son interesantes para seguir evaluándolas. Se requiere trabajar con ambos sistemas, ajustar algunas condiciones experimentales y llegar a las concentraciones mínimas inhibitorias para poder tener alguna preferencia.

Muchas de estas conclusiones serán utilizadas como disparadores de hipótesis para futuros estudios

VII. Referencias Bibliográficas.

VII. Referencias Bibliográficas

- 3M. Ciencia aplicada a la vida. 3M Argentina. http://www.3m.com.ar/3M/es_AR/inicio/?WT.mc_id=www.3m.com.ar
- A.N.M.A.T. Código Alimentario Argentino. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Abdullah, N. I. S. B., Ahmad, M. B., & Shameli, K. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus elasticus* stem bark extract. *Chemistry Central Journal*, 9(1), 61. <http://doi.org/10.1186/s13065-015-0133-0>
- Abreu, A. S., Oliveira, M., De Sá, A., Rodrigues, R. M., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Machado, A. V. (2015). Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging. *Carbohydrate Polymers*, 129, 127–134. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.021>
- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K., Kitamura, K., Mikami, B., & Utsumi, S. (2003). Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 7395–400. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832158100>
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.*, 4(8), 3974–3983. <http://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2–9. <http://doi.org/10.1016/j.fbio.2012.12.001>
- Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2014). Anthocyanins contents, profiles, and color characteristics of red cabbage extracts from different cultivars and maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7524–7531. <http://doi.org/10.1021/jf501991q>
- Ahvenainen, R. (2003). *Novel Food Packaging Techniques*. Novel Food Packaging Techniques. Elsevier Ltd. Retrieved.
- Albert, S., & Mittal, G. S. (2002). Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. *Food Research International*, 35(5), 445–458. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00139-9)
- Ali, S. W., Rajendran, S., & Joshi, M. (2011). Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 438–446. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.004>
- Alighourchi, H., & Barzegar, M. (2009). Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 179–185. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.019>
- Alocilja, E. C., & Radke, S. M. (2003). Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6). [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00009-5)
- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2009). Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International*, 42(8), 1113–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.010>

- Andreuccetti, C., Carvalho, R. a., & Grosso, C. R. F. F. (2010). Gelatin-based films containing hydrophobic plasticizers and saponin from *Yucca schidigera* as the surfactant. *Food Research International*, 43(6), 1710–1718. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.013>
- Andreuccetti, C., Carvalho, R. a., Galicia-García, T., Martínez-Bustos, F., & Grosso, C. R. F. (2011). Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.007>
- AOAC. (1980). *Official methods of analysis* (13th ed.) Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Apisariyakul, a, Vanittanakom, N., & Buddhasukh, D. (1995). Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol*, 49, 163–169. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01320-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01320-2)
- Arapitsas, P., Sjöberg, P. J. R., & Turner, C. (2008). Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 109(1), 219–226. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.030>
- Arvanitoyannis, I. S. I. S., & Stratakos, A. C. A. C. (2012). Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1423–1446. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0803-z>
- Asghar, A., & Henrickson, R. L. (1982). Chemical, Biochemical, Functional, and Nutritional Characteristics of Collagen in Food Systems (pp. 231–372). [http://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60113-5](http://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60113-5)
- ASTM. (2004). *Annual book of ASTM standards*. Philadelphia, PA, USA: ASTM
- Astrid, G. G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.
- Atarés, L., De Jesús, C., Talens, P., & Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.004>
- Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1–2), 293–301. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.058>
- Azeredo, H. M. C. de. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240–1253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.019>
- Badley, R. A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J. P., & Stubbs, J. M. (1975). The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 412(2), 214–228. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90036-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90036-7)
- Bajpai, S. K., Chand, N., & Ahuja, S. (2015). International Journal of Biological Macromolecules Investigation of curcumin release from chitosan / cellulose micro crystals antimicrobial films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 440–448. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.012>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Baldwin, E. A., Bai, J., Plotto, A., & Dea, S. (2011). Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries. *Sensors*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/s110504744>
- Bankura, K. P., Maity, D., Mollick, M. M. R., Mondal, D., Bhowmick, B., Bain, M. K., Chattopadhyay, D. (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1159–1165. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.089>

- Baptista Golasz, L., Silva, J. Da, Botelho, S., Silva, D., Golasz, L., Silva, J. Da, & Silva, S. (2013). Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 2012(1), 155–162. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500023>
- Barbosa-Pereira, L., Cruz, J. M., Sendón, R., Rodríguez Bernaldo de Quirós, A., Ares, A., Castro-López, M., Paseiro-Losada, P. (2013). Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. *Food Control*, 31(1), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.036>
- Barclay, L. R., Vinqvist, M. R., Mukai, K., Goto, H., Hashimoto, Y., Tokunaga, A., & Uno, H. (2000). On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. *Organic Letters*, 2(18), 2841–3.
- Becker, T. (2000). Consumer perception of fresh meat quality: a framework for analysis. *British Food Journal*, 102(3), 158–176. <http://doi.org/10.1108/00070700010371707>
- Beg, M. D. H., Pickering, K. L., & Weal, S. J. (2005). Corn gluten meal as a biodegradable matrix material in wood fibre reinforced composites. *Materials Science and Engineering: A*, 412(1–2), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2005.08.015>
- Belay, Z. A., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2016). Modelling approaches for designing and evaluating the performance of modified atmosphere packaging (MAP) systems for fresh produce: A review. *Food Packaging and Shelf Life*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.08.001>
- Bhat, R., & Karim, A. A. (2009). Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin. *Food Chemistry*, 113(4), 1160–1164. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.039>
- Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Mohan, C. O., & Srinivasa Gopal, T. K. (2015). Smart packaging systems for food applications: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6125–6135. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1766-7>
- Bodenhamer WT, Jackowski G, Davies E (2004) Toxin Alert: Surface binding of an immunoglobulin to a flexible polymer using a water soluble varnish matrix. United States patent: 66992973.
- Bohlmann, G. M. (2007). Bioplastics & biofuels: Pricing & production trends. *Industrial Biotechnology*, 3(1), 25–28. <https://doi.org/10.1089/ind.2007.3.025>
- Boo, H.-O., Hwang, S.-J., Bae, C.-S., Park, S.-H., Heo, B.-G., & Gorinstein, S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, 40, 129–135. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.042>
- Boscher, N. D., Bohn, T., Heier, P., Moisy, F., Untereiner, B., Heinze, K., & Choquet, P. (2014). Optical sensing responses of CrIII(Cl)(TPP)(H₂O)-based coatings obtained by an atmospheric pressure plasma method - Application to the detection of volatile amines. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 191, 553–560. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2013.10.044>
- Boscolo, A., Menosso, E., Piuze, B., & Toppano, M. (2006). Thermocromic Materials for Temperature Sensors in New Applications. In *Device Applications of Nonlinear Dynamics* (pp. 139–144). Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/3-540-33878-0_11
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16, 1–9.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M., Hagens, W., Bulder, A., De Heer, C., Marvin, H. J. P. (2007). Health impact of nanotechnologies in food production. RIKILT - Institute of Food Safety.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bradley, E. L., Castle, L., & Chaudhry, Q. (2011). Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*, 22(11), 604–610. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.002>
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Koelsch Sand, C., & Mchugh, T. H. (2008.). *Innovative Food Packaging Solutions*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00933.x>

- Bulushi, I. Al, Poole, S., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2009). Biogenic Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 369–377. <http://doi.org/10.1080/10408390802067514>
- Buzby, J. C., Wells, H. F., & Hyman, J. (2014). The Estimated Amount, Value, and Calories of Postharvest Food Losses at the Retail and Consumer Levels in the United States United States Department of Agriculture. <http://doi.org/10.2139/ssrn.2501659>
- Calzada Lorenzo, D. de la, & la, D. de. (2016). Trabajo de revisión bibliográfica de materiales termocrómicos para su integración en aplicaciones de uso industrial.
- Campos, C., Gerschenson, L., & Flores, S. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Cao, N., Fu, Y., & He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1153–1162. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.001>
- Carrillo C. Audisio, L. M., & Ancasi M. Benítez. Ahrendts, Eg. (2007). Manual de microbiología de los alimentos. Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU.
- Carvalho, R. a., Sobral, P. J. a, Thomazine, M., Habitante, a. M. Q. B., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22, 1117–1123. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.003>
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86(1), 69–77. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.011>
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C. C., & Raghavarao, K. S. M. S. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 615–623. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004>
- Chen, X., Li, D., Li, G., Luo, L., Ullah, N., Wei, Q., & Huang, F. (2015). Facile fabrication of gold nanoparticle on zein ultrafine fibers and their application for catechol biosensor. *Applied Surface Science*, 328, 444–452. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.12.070>
- Chevron, P., Gouanvé, F., & Espuche, E. (2015). Starch/silver nanocomposite: Effect of thermal treatment temperature on the morphology, oxygen and water transport properties. *Carbohydrate Polymers*, 134, 635–645. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.067>
- Chi, S., Zivanovic, S., & Penfield, M. P. (2006). Application of Chitosan Films Enriched with Oregano Essential Oil on Bologna. *Active Compounds and Sensory Attributes*. <https://doi.org/10.1177/1082013206063845>
- Choudhary, R., & Bandla, S. (2012). Ultraviolet Pasteurization for Food Industry. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2(1), 12–15. <http://doi.org/10.5923/j.food.20120201.03>
- Cian, R. E., Salgado, P. R., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2014). Effect of glycerol and Ca + 2 addition on physicochemical properties of edible carrageenan / porphyran-based films obtained from the red algae, *Pyropia columbina*. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0449-5>
- Ciosek, P., Brzózka, Z., & Wróblewski, W. (2006). Electronic tongue for flow-through analysis of beverages. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 118(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.051>
- Cisneros-Zevallos, L., & Krochta, J. M. (2005). Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables. Understanding relative humidity effects. *Innovations in Food Packaging*, 67(8), 173–184. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50043-7>
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1063::AID-JSFA605>3.0.CO;2-Q)
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.035>

- Condés, M. C. (2012). Películas compuestas y nanocompuestas, biodegradables y/o comestibles, en base a proteínas de amaranto y almidones de distinto origen botánico. Facultad de ciencias exactas , UNLP.
- Condés, M. C., Añón, M. C., & Mauri, A. N. (2013). Amaranth protein films from thermally treated proteins. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 573–579. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.006>
- Condés, M. C., Añón, M. C., Mauri, A. N., & Dufresne, A. (2015). Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*, 47, 146–157. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.026>
- Condés M. C., Echeverría I., Añón M. C. and Mauri A. N. (2016). Chapter 15: Nanocompounds as formulating aids.
- Condés, M. C., Speroni, F., Mauri, A., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.006>
- Coutinho, M. R., Quadri, M. B., Moreira, R. F. P. M., & Quadri, M. G. N. (2004). Partial Purification of Anthocyanins from Brassica oleracea (Red Cabbage). *Separation Science and Technology*, 39(16), 3769–3782. <http://doi.org/10.1081/SS-200036539>
- Craig S. Charron, Beverly A. Clevidence, Steven J. Britz, and Novotny, J. A. (2007). Effect of Dose Size on Bioavailability of Acylated and Nonacylated Anthocyanins from Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata). <http://doi.org/10.1021/JF0710736>
- Cruz, J. M., Conde, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes. *Food Chemistry*, 100(3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.012>
- Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2004). Assessment of the production of antioxidants from winemaking waste solids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.012>
- Cuq, B., Gontard, N., & Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75(1), 1–9. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.1.1>
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., & Cummins, E. (2013). Migration and exposure assessment of silver from a PVC nanocomposite. *Food Chemistry*, 139(1–4), 389–397. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.045>
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science and Technology*, 19(SUPPL. 1), S103–S112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011>
- Darroudi, M., Ahmad, M. Bin, Abdullah, A. H., & Ibrahim, N. A. (2011). Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 569–74. <http://doi.org/10.2147/IJN.S16867>
- Day, B. P. F. (2003). Novel MAP applications for fresh-prepared produce. *Novel Food Packaging Techniques*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-675-7.50014-6>
- Day, B. P. F. (2008). Modified atmosphere and active packaging of chilled foods. In *Chilled Foods* (pp. 158–187). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845694883.1.158>
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (2000). Edible barriers: A solution to control water migration in foods. *Food Packaging*, 753, 9–16.
- Denavi, G. a., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23, 2094–2101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.007>
- Denavi, G., Tapia-Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P. J. a, Mauri, a. N., & Menegalli, F. C. (2009). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90, 341–349. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.001>

- Díaz, O., Candia, D., & Cobos, Á. (2016). Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. *Food Hydrocolloids*, 55, 189–199. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.019>
- Dietz JE ,Elliott, BJ , Peppas, N. (1995). Real-time attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy to monitor multiacrylate polymerization reactions. *Macromolecules*, 28(15), 5163–5166. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3602022>
- Djabourov, M., Lechaire, J. P., & Gaill, F. (1993). Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*, 30(3–4), 191–205. <http://doi.org/10.1080/10643389.2012.728825>
- Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active And Intelligent Packaging Food – Research And Development – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1). <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0091-3>
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1–24. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017>
- Dutta, P. K. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
- Eagland D., (2004). Patent Polymeric materials incorporating a ph indicator dye. US20070276207.
- Echeverría, I. (2012). Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Echeverría, I., Eisenberg, P., & Mauri, A. N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 449, 15–26. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.08.006>
- Echeverría, I., Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2016). Structure, Functionality, and Active Release of Nanoclay Soy Protein Films Affected by Clove Essential Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 9(11), 1937–1950. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1777-z>
- El-Chaghaby, G y Ahmad, A. (2011). biosynthesis of silver nanoparticles using Pistacia lentiscus leaves extract and investigation of their antimicrobial effect. *Oriental Journal of Chemistry* 2011, Vol. 27, No. (3): Pg. 929-936
- Ellouze, M., y Augustin, J.-C. (2010). Applicability of biological time temperature integrators as quality and safety indicators for meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 119–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.012>
- Emco Packaging (2013) Oxygen indicator labels. Oxygen indicating colour change chemistry. <http://www.emcopackaging.com/>
- Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>
- Eom, K.-H., Hyun, K.-H., Lin, S., & Kim, J.-W. (2014). The Meat Freshness Monitoring System Using the Smart RFID Tag. *International Journal of Distributed Sensor Networks*, 10(7), 591812. <https://doi.org/10.1155/2014/591812>
- Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 192–198. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.021>
- Eustis, S., El-Sayed, M. A., El-Sayed, M. A., Meltzer, S., Requicha, A. A. G., Atwater, H. A., ... Huang, J. (2006). Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.*, 35(3), 209–217. <http://doi.org/10.1039/B514191E>
- Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R. D., & Johnson, S. K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.002>

- FAO, Organización Mundial de la Salud. CODEX Alimentarius: Normas Oficiales de <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/es/>
- Fennema, O.R. (2010). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia SA.
- Fernández-López, C., Mateo-Mateo, C., Álvarez-Puebla, R. A., Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., & Liz-Marzán, L. M. (2009). Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir*, 25(24), 13894–13899. <http://doi.org/10.1021/la9016454>
- Ferreira, F. D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C. C., Da Costa, C. L., Mallmann, C. A., Janeiro, V., Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136(2), 789–793. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.003>
- Flores, C. (2014). “Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida”. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Flueki, T., Francis, F.J., 1986. Quantitative methods for anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.* 33, 78–83.
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food protein functionality: A comprehensive approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853–1864. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.008>
- Food Packaging Forum | The Food Packaging Forum makes scientific facts and expert opinions about food packaging health accessible and understandable to all. <http://www.foodpackagingforum.org/>
- Forbes, W. F., & Sullivan, P. D. (1966). The effect of radiation on collagen I. Electron-spin resonance spectra of 2537-Å-irradiated collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics Including Photosynthesis*, 120(2), 222–228. [http://doi.org/10.1016/0926-6585\(66\)90341-4](http://doi.org/10.1016/0926-6585(66)90341-4)
- Francis, F. J., & Markakis, P. C. (1989). Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28(4), 273–314. <http://doi.org/10.1080/10408398909527503>
- Franke, I., Wijma, E., & Bouma, K. (2002). Shelf life extension of pre-baked buns by an active packaging ethanol emitter. *Food Additives and Contaminants*, 19(3), 314–322. <https://doi.org/10.1080/02652030110072704>
- Franzetti, L., Martinoli, S., Piergiovanni, L., & Galli, A. (2001). Influence of Active Packaging on the Shelf-life- of Minimally Processed Fish Products in a Modified Atmosphere. *Packaging Technology and Science*, 14(6), 267–274. <https://doi.org/10.1002/pts.559>
- FreshPoint | Produce Distributor | Learn about FreshPoint <http://www.freshpoint.com/>
- Fuertes, G., Soto, I., Carrasco, R., Vargas, M., Sabattin, J., & Lagos, C. (2016). Intelligent Packaging Systems: Sensors and Nanosensors to Monitor Food Quality and Safety. *Journal of Sensors*. <https://doi.org/10.1155/2016/4046061>
- Fuertes, G., Soto, I., Vargas, M., Valencia, A., Sabattin, J., & Carrasco, R. (2016). Nanosensors for a monitoring system in intelligent and active packaging. *Journal of Sensors*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7980476>
- Fukushima, D. (1991). Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition. *Food Reviews International*, 7(3), 323–351. <https://doi.org/10.1080/87559129109540915>
- Gade, A., Ingle, A., Whiteley, C., & Rai, M. (2010). Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. *Biotechnology Letters*, 32(5), 593–600. <http://doi.org/10.1007/s10529-009-0197-9>
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Ortega, E. (2016). Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International*, 85, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.033>
- Galagan, Y., & Su, W. F. (2008). Fadable ink for time-temperature control of food freshness: Novel new time-temperature indicator. *Food Research International*, 41(6). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.012>

- Gao, X., Wei, L., Yan, H., & Xu, B. (2011). Green synthesis and characteristic of core-shell structure silver/starch nanoparticles. *Materials Letters*, 65(19–20), 2963–2965. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.06.020>
- Gardiol, A. E., Hernandez, R. J., Reinhammar, B., & Harte, B. R. (1996). Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(5). [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00110-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00110-7)
- Gennadios, A. (2002a). *Protein-based films and coatings*. CRC Press.
- Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (1998). Ultraviolet Radiation Affects Physical and 2347 Molecular Properties of Soy Protein Films. *Journal of Food Science*, 63(2), 3–6. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15714.x>
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A. C. A., Castelli, G., & Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.008>
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, a., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009). Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1322–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.010>
- Golasz, L., Silva, J., & Silva, S. (2013). Film with anthocyanins as an indicator of chilled pork deterioration. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 2012, 155–162. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500023>
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78–85. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.024>
- Gómez-Estaca, J., López-de-Dicastillo, C., Hernández-Muñoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014). Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35(1), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.008>
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 20(1), 3–16. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J., & Guilbert, S. (1994). Edible Composite Films of Wheat Gluten and Lipids, Water-Vapor Permeability and Other Physical-Properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39–50.
- Gorski J. R. & Booher, J. (2011). Processes for preparing a polymeric indicator film.
- Govindaraj, P., Kandasubramanian, B., & Kodam, K. M. (2014). Molecular interactions and antimicrobial activity of curcumin (*Curcuma longa*) loaded polyacrylonitrile films. *Materials Chemistry and Physics*, 147(3), 934–941. <http://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.06.040>
- Grumezescu Alexandru (2017). *Nanotechnology in the Agri-Food Industry : Food Packaging*. Elsevier Science.
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P., & Subirade, M. (1998). Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7(2–3), 149–157. [http://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00043-5](http://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00043-5)
- Guerrero, P., & de la Caba, K. (2010). Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 261–269. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.008>
- Guerrero, P., Stefani, P. M., Ruseckaite, R. a., & De La Caba, K. (2011). Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression molding. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 65–72. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.003>
- Guerrero-Martínez, A., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Recent Progress on Silica Coating of Nanoparticles and Related Nanomaterials. *Advanced Materials*, 22(11), 1182–1195. <https://doi.org/10.1002/adma.200901263>

- Guilbert S., Cuq B. (2005). Material formed from proteins. En: Handbook of biodegradable polymers. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, Inglaterra: Smithers. 339-384
- Guilbert, S., & Gontard, N. (2005). Agro-polymers for edible and biodegradable films. Review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. *Innovations in Food Packaging*, 263–276. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50048-6>
- Guillory, M., & Standhardt, G. (2012). NVC world review on supply chain applications of RFID and sensors in packaging. <http://www.nvc.nl/nl/pasteur-sensor-enabled-rfid/>
- Habbalalu, D., Lalley, J., Nadagouda, M., & Varma, R. (2013). Green techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. *Sustainable Chemistry*, 1 (7), pp 703–712. <https://doi.org/10.1021/sc4000362>
- Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L. S., Abu Bakar, F., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, 5, 96–106. <http://doi.org/10.2174/1874285801105010096>
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
- Hajzeri, M., Bašnec, K., Bele, M., & Gunde, M. K. (2015). Influence of developer on structural, optical and thermal properties of a benzofluoran-based thermochromic composite. *Dyes and Pigments*, 113, 754–762. <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.10.014>
- Han, J. H. (2000). Antimicrobial Food Packaging. *Food Technology*, 54(3).
- Han, J. H. (2014). Edible Films and Coatings. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>
- Han, J. H., Seo, G. H., Park, I. M., Kim, G. N., & Lee, D. S. (2006). Physical and Mechanical Properties of Pea Starch Edible Films Containing Beeswax Emulsions. *Journal of Food Science*, 71(6), E290–E296. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00088.x>
- Han, J., & Scanlon, M. (2005). Mass transfer of gas and solute through packaging materials. *Innovations in Food Packaging*, (1980), 12–23. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50034-6>
- Harris, W. S. (2007). International recommendations for consumption of long-chain omega-3 fatty acids. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 8 (Suppl 1), S50–S52. <https://doi.org/10.2459/01.JCM.0000289274.64933.45>
- Heising, J. K., Dekker, M., Bartels, P. V., & (Tiny) Van Boekel, M. A. J. S. (2014). Monitoring the Quality of Perishable Foods: Opportunities for Intelligent Packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5). <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.600477>
- Hernandez-Izquierdo, V. M., & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review. *Journal of Food Science*, 73(2), R30-9. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00636.x>
- Hill, J. E., & Breidenbach, R. W. (1974). Proteins of Soybean Seeds. *Plant Physiol*, 53, 747–751.
- Hogan, S. A., & Kerry, J. P. (2008). Smart Packaging of Meat and Poultry Products. In *Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods* (pp. 33–59). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470753699.ch3>
- Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 66–73. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.046>
- Hrazdina, G., Iredale, H., Mattick, L.R., 1977. Anthocyanin composition of Brassica oleracea cv. Red Danish. *Phytochemistry* 16, 297–299.
- Huang, W. D., Deb, S., Seo, Y. S., Rao, S., Chiao, M., & Chiao, J. C. (2012). A passive radio-frequency pH-Sensing tag for wireless food-quality monitoring. *IEEE Sensors Journal*, 12(3), 487–495. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2011.2107738>

- Ikan, R. (1991). *Natural Products: A Laboratory Guide*. (Second Edition)
- Insignia Technologies. <http://insigniatechnologies.com/>
- Foulk J. A. & Bunn, J. M. (2001). Physical and barrier properties of developed bilayer protein films. *Applied Engineering in Agriculture*, 17(5), 635. <https://doi.org/10.13031/2013.6901>
- Jacob, J. A., Mahal, H. S., Mukherjee, T., & Kapoor, S. (2011). Free radical reactions with the extract of brassica family. *Food Chemistry*, 129(3), 1132–1138. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.091>
- Janik, L. J., Cozzolino, D., Damberg, R., Cynkar, W., & Gishen, M. (2007). The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 594(1), 107–118. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.019>
- Janjarasskul, T. & Krochta, J.M. (2010). Edible Packaging materials. *Annual review of food science and technology* 1: 415-448
- Wagner J. R., Sorgentini D. A., & Añón M. C. (1996). Thermal and Electrophoretic Behavior, Hydrophobicity, and Some Functional Properties of Acid-Treated Soy Isolates. *Agric. Food Chem.*, 44 (7), pp 1881–1889. <http://doi.org/10.1021/JF950444S>
- Jung, J., Puligundla, P., & Ko, S. (2012). Proof-of-concept study of chitosan-based carbon dioxide indicator for food packaging applications. *Food Chemistry*, 135(4). <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.090>
- Kahn, M. L., Glaria, A., Pages, C., Monge, M., Saint Macary, L., Maisonnat, A, Manna, L. (2009). Organometallic chemistry: an alternative approach towards metal oxide nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 19(24), 4044. <http://doi.org/10.1039/b818935h>
- Kalia, A., & Parshad, V. R. (2015). Novel Trends to Revolutionize Preservation and Packaging of Fruits/Fruit Products: Microbiological and Nanotechnological Perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 159–182. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.649315>
- Kanmani, P., & Rhim, J. W. (2014). Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. *Food Chemistry*, 148, 162–169. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.047>
- Kapetanakou, A. E. A. E., & Skandamis, P. N. (2016). Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. *Current Opinion in Food Science*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.06.001>
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563–576. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Kato, Y., Uchida, K., & Kawakishi, S. (1992). Oxidative degradation of collagen and its model peptide by ultraviolet irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(3), 373–379. <http://doi.org/10.1021/jf00015a003>
- Kechinski, C. P., Guimarães, P. V. R., Noreña, C. P. Z., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2010). Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. *Journal of Food Science*, 75(2), C173–C176. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01479.x>
- Kerry, J. P. (2012). Application of smart packaging systems for conventionally packaged muscle-based food products. *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1533/9780857095718.4.522>
- Kerry, J. P. P., O’Grady, M. N., Hogan, S. A. a., O’Grady, M. N., & Hogan, S. A. a. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74(1), 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.024>
- Kerry, J., & Butler, P. (2008). *Smart packaging technologies for fast moving consumer goods*. John Wiley & sons, ltd.
- Kester, J.J. Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology*.

- Kim, K. M., Weller, C. L., Hanna, M. A., & Gennadios, A. (2002). Heat Curing of Soy Protein Films at Selected Temperatures and Pressures. *LWT - Food Science and Technology*, 35(2), 140–145. <http://doi.org/10.1006/fstl.2001.0825>
- Kim, M. J., Jung, S. W., Park, H. R., & Lee, S. J. (2012). Selection of an optimum pH-indicator for developing lactic acid bacteria-based time – temperature integrators (TTI). *Journal of Food Engineering*, 113(3), 471–478. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.018>
- Koskela, J., Sarfraz, J., Ihalainen, P., Määttä, A., Pulkkinen, P., Tenhu, H., Peltonen, J. (2015). Monitoring the quality of raw poultry by detecting hydrogen sulfide with printed sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 218, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.093>
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.008>
- Kuan, S. L., Wu, Y., & Weil, T. (2013). Precision Biopolymers from Protein Precursors for Biomedical Applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 34(5), 380–392. <http://doi.org/10.1002/marc.201200662>
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- Kusunoki, H., Shin, K., Kokubo, Y, Kaneko, S., Sekiyama, Y and Uemura, T. (1998). Antimicrobial activity of allyl isothiocyanate against low temperature growth bacteria. *Japan. J. Food Microbiol.* 15, 107-112.
- Kuswandi, B., Jayus, Oktaviana, R., Abdullah, A., y Heng, L. Y. (2014). A novel on-package sticker sensor based on methyl red for real-time monitoring of broiler chicken cut freshness. *Packaging Technology and Science*, 27(1). <https://doi.org/10.1002/pts.2016>
- Kuswandi, B., Jayus, Restyana, A., Abdullah, A., Heng, L. Y., y Ahmad, M. (2012). A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food Control*, 25(1), 18–189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.008>
- Kuswandi, B., Wicaksono, Y., Jayus, Abdullah, A., Heng, L. Y., y Ahmad, M. (2011). Smart packaging: Sensors for monitoring of food quality and safety. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 5(3–4). <https://doi.org/10.1007/s11694-011-9120-x>
- Lagaron, J. M., Lopez-Rubio, A., Fabra, M. J., & Pérez-Masiá, R. (2014). Chapter 31 – Microencapsulation and Packaging—Value Added Solutions to Product Development. *Microencapsulation in the Food Industry*, 399–408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00031-5>
- Laitonjam, W. S. (2012). Natural antioxidants (NAO) of plants acting as scavengers of free radicals. *Studies in Natural Products Chemistry (Vol. 37)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00009-2>
- Lawhavinit, O. a., Kongkathip, N., & Kongkathip, B. (2010). Antimicrobial activity of curcuminoids from *Curcuma Longa L.* on pathogenic bacteria of shrimp and chicken. *Kasetsart Journal Natural Science*, 44, 364–371.
- Lawrie, K., Mills, A., & Hazafy, D. (2013). Simple inkjet-printed, UV-activated oxygen indicator. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.125>
- Lawton, B. A., & Pethig, R. (1993). Determining the fat content of milk and cream using AC conductivity measurements. *Measurement Science and Technology*, 4(1). <https://doi.org/10.1088/0957-0233/4/1/007>
- Lee, K., & Ko, S. (2014). Proof-of-concept study of a whey protein isolate based carbon dioxide indicator to measure the shelf-life of packaged foods. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 115–120. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0015-6>

- Lee, M., Lee, S., & Song, K. Bin. (2005). Effect of uv-irradiation on the physicochemical properties of soy protein isolate films. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.01.006>
- Lee, S. J., & Rahman, A. T. M. M. (2013). *Intelligent Packaging for Food Products*. In *Innovations in Food Packaging: Second Edition* (pp. 171–209). Elsevier.
- Lee, S. Y. J., Lee, S. Y. J., Choi, D. S., & Hur, S. J. (2015). Current topics in active and intelligent food packaging for preservation of fresh foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2799–2810. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7218>
- Li, J. H., Miao, J., Wu, J. L., Chen, S. F., & Zhang, Q. Q. (2014). Preparation and characterization of active gelatin-based films incorporated with natural antioxidants. *Food Hydrocolloids*, 37, 166–173. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.015>
- Liu, B., Xu, H., Zhao, H., Liu, W., Zhao, L., & Li, Y. (2016). Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 157, 842–849. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.067>
- Liu, C.-C., Tellez-Garay, A. M., & Castell-Perez, M. E. (2004). Physical and mechanical properties of peanut protein films. *LWT. Food Science and Technology*, 37(7), 731–738. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.012>
- Liu, X., Xiao, G., Chen, W., Xu, Y., & Wu, J. (2004). Quantification and Purification of Mulberry Anthocyanins with Macroporous Resins. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 5(5), 326–331. <http://doi.org/10.1155/S1110724304403052>
- Liu, Y., Chakrabartty, S., & Alocilja, E. C. (2007). Fundamental building blocks for molecular biowire based forward error-correcting biosensors. *Nanotechnology*, 18(42), 424017. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/42/424017>
- Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P. a., Trbojevič, R., & Fernandez, A. (2012). Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 24(1), 19–29. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.001>
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Che, C. M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. <http://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H; Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527–534. <http://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>
- López-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catala, R., & Gavara, R. (2004). Overview of Active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. *Food Reviews International*, 20(4), 357–387. <https://doi.org/10.1081/LFRI-200033462>
- Ma, Q., Du, L., & Wang, L. (2017). Tara gum/polyvinyl alcohol-based colorimetric NH₃ indicator films incorporating curcumin for intelligent packaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 244, 759–766. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.035>
- Maciel, V. B. V., Franco, T. T., & Yoshida, C. M. P. (2012). Sistemas inteligentes de embalajes utilizando películas de quitosano como indicador colorimétrico de temperatura. *Polímeros*, 22, 00–00. <http://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000054>
- Mahdavi, S. A., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Assadpoor, E. (2014). Spray-Drying Microencapsulation of Anthocyanins by Natural Biopolymers: A Review. *Drying Technology*, 32(5), 509–518. <http://doi.org/10.1080/07373937.2013.839562>
- Malhotra, B., Keshwani, A., & Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00611>
- Mallikarjunan, P., Chinnan, M., Balasubramaniam, V., y Phillips, r. (1997). Edible Coatings for Deep-fat Frying of Starchy Products1. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 30(7), 709–714. <https://doi.org/10.1006/fstl.1997.0263>

- Maniglia, B. C., de Paula, R. L., Domingos, J. R., & Tapia-Blácido, D. R. (2015). Turmeric dye extraction residue for use in bioactive film production: Optimization of turmeric film plasticized with glycerol. *LWT Food Science and Technology*, 64(2), 1187–1195. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.025>
- Maniglia, B. C., Domingos, J. R., de Paula, R. L., & Tapia-Blácido, D. R. (2014). Development of bioactive edible film from turmeric dye solvent extraction residue. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 269–277. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.011>
- Carbone M., Donia D. T., G. S., Sabbatella, G., Antiochia R. (2016). Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *Journal of King Saud University - Science*, 28(4), 273–279. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.05.004>
- Market Research Reports & Consulting | Grand View Research, Inc. de <http://www.grandviewresearch.com/>
- Martínez-Abad, A., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. (2012). Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films for food-packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21), 5350–5359. <http://doi.org/10.1021/jf300334z>
- Martínez-Olmos, A., Fernández-Salmerón, J., Lopez-Ruiz, N., Rivadeneyra Torres, A., Capitan-Vallvey, L. F., & Palma, A. J. (2013). Screen Printed Flexible Radiofrequency Identification Tag for Oxygen Monitoring. *Analytical Chemistry*, 85(22), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/ac4028802>
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.009>
- Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Utsumi, S. (2001). Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. *European Journal of Biochemistry*, 268(12), 3595–3604. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02268.x>
- Mascheroni, E., Chalier, P., Gontard, N., & Gastaldi, E. (2010). Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 406–413. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.007>
- Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010>
- Mattila, T., Tawast, J., & Ahvenainen, R. (1990). New possibilities for quality control of aseptic packages: microbiological spoilage and seal defect detection using head-space indicators. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 23(3), 246–251.
- Mauri A.N., Añon M.C. (2012). Capítulo 4: Proteínas como envases alimentarios. En: *Películas y Recubrimientos Comestibles: Propiedades y aplicaciones en alimentos*. Eds.: Olivas G.I., Soliva-Fortuni R., Martín-Belloso O., González-Aguilar G. Editorial Clave, México. Pág. 95.
- Mauri, A. N., & Añon, M. C. (2008). Mechanical and Physical Properties of Soy Protein Films with pH-Modified Microstructures. *Food Science and Technology International*, 14, 119–125. <https://doi.org/10.1177/1082013208092130>
- Mauri, A. N., & Añon, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(7), 1064–1072. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2457>
- Mayet, N., Kumar, P., Choonara, Y. E., Tomar, L. K., Tyagi, C., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2014). Synthesis of a Semi-Interpenetrating Polymer Network as a Bioactive Curcumin Film. *AAPS PharmSciTech*, 15(6), 1476–1489. <http://doi.org/10.1208/s12249-014-0170-3>
- McClements, D. J. (2015). Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability. *Journal of Food Science*, 80(7), N1602–N1611. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12919>

- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage, stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285–1294. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.004>
- Mehanny, M., Hathout, R. M., Geneidi, A. S., & Mansour, S. (2016). Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule; Curcumin and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 225, 1–30. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.018>
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., & Jiménez, A. (2015). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2), 83–89. <https://doi.org/10.1002/app.42631>
- Melo, A. A. M. de, Geraldine, R. M., Silveira, M. F. A., Torres, M. C. L., Rezende, C. S. M. E, Fernandes, T. H., & Oliveira, A. N. de. (2012). Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1419–1427. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400025>
- Mendieta-Taboada, O., Sobral, P. J. D. a, Carvalho, R. a., & Habitante, A. M. B. Q. (2008). Thermomechanical properties of biodegradable films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol). *Food Hydrocolloids*, 22, 1485–1492. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.10.001>
- MERCOSUR. Reglamento MERCOSUR. de http://www.mercosur.int/msweb/portal/intermediario/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/RES_056-1992.pdf
- Metak, A. M., Nabhani, F., & Connolly, S. N. (2015). Migration of engineered nanoparticles from packaging into food products. *LWT. Food Science and Technology*, 64(2), 781–787. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.001>
- Metak, A.M.; Ajaal, T., (2013). Investigation on polymer based nano-silver as food packaging material. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* Vol:7, 780-786.
- Micard V., Morel M.H., Bonicel J., Guilbert S. (2001). Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation. *Polymer* 42: 477-485. <http://doi.org/10.1021/jf0001785>
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M.-H., & Guilbert, S. (2000). Properties of Chemically and physically Treated Wheat Gluten Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2948–2953. <http://doi.org/10.1021/jf0001785>
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228–237. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01051-0](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01051-0)
- Mills, A. (2005). Oxygen indicators and intelligent inks for packaging food. *Chemical Society Reviews*, 34(12). <https://doi.org/10.1039/b503997p>
- Mlalila, N., Kadam, D. M., Swai, H., & Hilonga, A. (2016). Transformation of food packaging from passive to innovative via nanotechnology: concepts and critiques. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3395–3407. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2325-6>
- Mobili, P., de los Ángeles Serradell, M., Trejo, S. A., Avilés Puigvert, F. X., Abraham, A. G., y De Antoni, G. L. (2009). Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(4), 363–372. <http://doi.org/10.1007/s10482-009-9322-y>
- Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014, 186864. <http://doi.org/10.1155/2014/186864>
- Mohan, S., Oluwafemi, O. S., Songca, S. P., Jayachandran, V. P., Rouxel, D., Joubert, O, Thomas, S. (2016). Synthesis, antibacterial, cytotoxicity and sensing properties of starch-capped silver nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 213, 75–81. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.010>
- Monedero F.M., Fabra M.J., Talens P., Chiralt A. (2009). Effect of oleic acid–beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering* 91: 509–515. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.014>

- Moraes, A. R. F. E., Gouveia, L. E. R., Soares, N. de F. F., Santos, M. M. de S., & Gonçalves, M. P. J. C. (2007). Development and evaluation of antimicrobial film on butter conservation. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 27, 33–36. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000500006>
- Morillon V., Debeaufort, F., Capelle, Blond, G. & Voilley, A. (1999). Influence of the Physical State of Water on the Barrier Properties of Hydrophilic and Hydrophobic Films. <https://doi.org/10.1021/JF990809Z>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- Morris, R. (2004). Food borne pathogen sensor and method.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.002>
- Nerín de la Puerta, M. C. C., Gutierrez Bartolome, I., & Sanchez Jarabo, C. (2010). Envase inteligente para la detección de microorganismos.
- Niamsa, N. & Sittiwet, C. (2009). Antimicrobial activity of Curcuma longa aqueous extract. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1-5.
- Niño-Martínez, N., Martínez-Castañón, G. A., Aragón-Piña, A., Martínez-Gutierrez, F., Martínez-Mendoza, J. R., & Ruiz, F. (2008). Characterization of silver nanoparticles synthesized on titanium dioxide fine particles. *Nanotechnology*, 19(6), 65711. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/19/6/065711>
- Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S., & Phillips, G. O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39, 301–318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>
- Nopwinyuwong, A., Trevanich, S., & Suppakul, P. (2010). Development of a novel colorimetric indicator label for monitoring freshness of intermediate-moisture dessert spoilage. *Talanta*, 81(3). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.008>
- Nur Hanani, Z. a., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2012). Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.015>
- Nur Hanani, Z. a., Roos, Y. H., & Kerry, J. P. (2012). Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 144–151. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.015>
- Oliveira, M., Abadias, M., Usall, J., Torres, R., Teixidó, N., & Viñas, I. (2015). Application of modified atmosphere packaging as a safety approach to fresh-cut fruits and vegetables - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.017>
- Orliac O., Rouilly A., Silvestre F., Rigal L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer* 43: 5417-5425.
- Ortiz, C. M., & Vicente, A. R. (2014). Combined use of physical treatments and edible coatings in fresh produce : moving beyond. *Stewart Postharvest Review*
- Ortiz, C. M., Cristian, L., & Ortiz, M. (2015). “Estrategias para mejorar la funcionalidad y aplicabilidad de películas en base a proteínas de soja.” Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Ortiz, C. M., de Moraes, J. O., Vicente, A. R., Laurindo, J. B., & Mauri, A. N. (2017). Scale-up of the production of soy (*Glycine max* L.) protein films using tape casting: Formulation of film-forming suspension and drying conditions. *Food Hydrocolloids*, 66, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.029>
- Ortiz, C. M., Mauri, A. N., & Vicente, A. R. (2013). Use of soy protein based 1-methylcyclopropene-releasing pads to extend the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 281–287. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.004>

- Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B.-S., Bilbao-Sainz, C., Bechtel, P. J., & McHugh, T. H. (2012). Ultraviolet-B Radiation Induced Cross-linking Improves Physical Properties of Cold- and Warm-Water Fish Gelatin Gels and Films. *Journal of Food Science*, 77(9), E215–E223. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02839.x>
- Ou S., Wang Y., Tang S., Huang C., Jackson M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering* 70: 205-210
- Salgado P. R., Molina Ortiz S. E., Denavi G. A., Bosch M. A., Añón M. C., Mauri A. N. (2016). Influence of initial protein structure on the properties of soybean protein edible films, 1–26.
- Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Tong, K., Farrell, A., Quilty, B., & Diamond, D. (2007). Food Chemistry Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage, 102, 466–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.052>
- Pacquit, A., Lau, K. T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B., & Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*, 69(2), 515–20. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.10.046>
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–20. <http://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Papkovsky, D. B., Smiddy, M. A., Papkovskaia, N. Y., & Kerry, J. P. (2002). Nondestructive measurement of oxygen in modified atmosphere packaged hams using a phase-fluorimetric sensor system. *Journal of Food Science*, 67(8). <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08877.x>
- Peng, I. C., & Nielsen, S. S. (1986). Protein-Protein Interactions Between Soybean Beta-conglycinin (B 1-B 6) and Myosin. *Journal of Food Science*, 51(3), 588–590. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13886.x>
- Pereira, V. A., de Arruda, I. N. Q., & Stefani, R. (2015). Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids*, 43, 180–188. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.014>
- Petrucelli, S., & Añón, M. C. (1995). Soy Protein Isolate Components and Their Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1762–1767. <https://doi.org/10.1021/jf00055a004>
- Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., Mieleszko, E., & Czaplicki, S. (2009). Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea*, *L. var. capitata*, *L. f. rubra*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1154–1158. <http://doi.org/10.1002/jsfa.3565>
- Podsędek, A., Sosnowska, D., Redzyna, M., & Koziółkiewicz, M. (2008). Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(10), 1770–1777. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01697.x>
- Pospiskova, K., Safarik, I., Sebel, M., & Kuncova, G. (2013). Magnetic particles-based biosensor for biogenic amines using an optical oxygen sensor as a transducer. *Microchimica Acta*, 180(3–4). <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0932-0>
- Potyriilo, R. A., Nagraj, N., Tang, Z., Mondello, F. J., Surman, C., & Morris, W. (2012). Battery-free Radio Frequency Identification (RFID) Sensors for Food Quality and Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8535–8543. <https://doi.org/10.1021/jf302416y>
- Selvakannan P. R., Swami A., Srisathiyarayanan D., Pravin S. Shirude, Pasricha R., Anandrao B. Mandale and, & Sastry M. (2004). Synthesis of Aqueous Au Core–Ag Shell Nanoparticles Using Tyrosine as a pH-Dependent Reducing Agent and Assembling Phase-Transferred Silver Nanoparticles at the Air–Water Interface. <http://doi.org/10.1021/LA049258J>
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry*. *Agriculture Food Chemistry*, 4290–4302.

- Priyadarsini, K., & Indira, K. (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. <http://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., & Ramirez-Tortosa, Mc. (2016). Curcumin and Health. *Molecules*, 21(3), 264. <http://doi.org/10.3390/molecules21030264>
- Puligundla, P., Jung, J., & Ko, S. (2012). Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications. *Food Control*, 25(1), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.043>
- Quezada-Gallo, J. A., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2000). Mechanism of aroma transfer through edible and plastic packagings: Are they complementary to solve the problem of aroma transfer? *ACS Symposium Series*, 753, 125–140. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0040524411&partnerID=tZOTx3y1>
- Raghavendra, G. M., Jung, J., kim, D., & Seo, J. (2016). Step-reduced synthesis of starch-silver nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 126–128. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.057>
- Rai, A., Prabhune, A., & Perry, C. C. (2010). Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. *Journal of Materials Chemistry*, 20(32), 6789. <http://doi.org/10.1039/c0jm00817f>
- Raju, D., Mendapara, R., & Mehta, U. J. (2014). Protein mediated synthesis of Au-Ag bimetallic nanoparticles. *Materials Letters*, 124, 271–274. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.03.087>
- Ramos, M., Valdés, A., Mellinas, A. C., & Garrigós, M. C. (2015). New Trends in Beverage Packaging Systems: A Review. *Beverages*, 1, 248272. <https://doi.org/10.3390/beverages1040248>
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98(3), 404–19. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.031>
- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1653–1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Fu, D., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (1999). Properties of Ultraviolet Irradiated Protein Films. *LWT - Food Science and Technology*, 32(3), 129–133. <https://doi.org/10.1006/fstl.1998.0516>
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2000). Solubility, Tensile, and Color Properties of Modified Soy Protein Isolate Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10) 4937–4941. <http://doi.org/10.1021/jf0005418>
- Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327–335. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.002>
- Rhim, J.-W., & Ng, P. K. W. (2007). Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(4), 411–433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>
- Rivero, S., García, M. A., & Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 531–539. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.021>
- Rivero, S., Giannuzzi, L., García, M. A., & Pinotti, A. (2013). Controlled delivery of propionic acid from chitosan films for pastry dough conservation. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 524–531. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.025>
- Robertson, C., & Kesselheim, A. S. (2016). Regulating off-label promotion - A critical test. *New England Journal of Medicine*, 375(24). <https://doi.org/10.1056/NEJMp1611755>
- Robertson, G. L. (2012). *Food Packaging : Principles and Practice*, Third Edition. CRC Press.

- Rojas-Graü M.A., Avena-Bustillos R.J., Olsen C., Friedman M., Henika P.R., Martín-Belloso O., Pan Z., McHugh T.H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* 81: 634–641
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Rooney, M. L. (2005). Introduction to active food packaging technologies. In *Innovations in Food Packaging* (pp. 63–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50037-1>
- Ross, J. (1991). Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. *Biochemical Education*, 19(2), 95–96. [http://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90020-9](http://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90020-9)
- Rouilly, A., Orliac, O., Silvestre, F., & Rigal, L. (2006). New natural injection-moldable composite material from sunflower oil cake. *Bioresource Technology*, 97(4), 553–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.022>
- Roy, S., Glueckert, R., Johnston, A. H., Perrier, T., Bitsche, M., Newman, T. A., Schrott-Fischer, A. (2012). Strategies for drug delivery to the human inner ear by multifunctional nanoparticles. *Nanomedicine*, 7(1), 55–63. <http://doi.org/10.2217/nnm.11.84>
- Roya, A. Q., & Elham, M. (2016). Intelligent food packaging: Concepts and innovations. *International Journal of ChemTech Research*, 9(6).
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7–8), 489–99.
- Sabnis, R. W. (2007). *Handbook of acid base indicators*. CRC Press.
- Sabnis, R. W. (2010). *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470586242>
- Saini, R. K., Ko, E. Y., & Keum, Y.-S. (2017). Minimally processed ready-to-eat baby-leaf vegetables: Production, processing, storage, microbial safety, and nutritional potential. *Food Reviews International*, 33(6). <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1204614>
- Sajilata, M. G., Savitha, K., Singhal, R. S., & Kanetkar, V. R. (2007). Scalping of Flavors in Packaged Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(1), 17–35. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00014.x>
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2012). Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 374–381. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.006>
- Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., & Montero, M. P. (2013). Sunflower protein films incorporated with clove essential oil have potential application for the preservation of fish patties. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 74–84. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.008>
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24(5), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.12.002>
- Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., & Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>
- Salgado, P. R., Ortiz, S. E. M., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2012). Functional food ingredients based on sunflower protein concentrates naturally enriched with antioxidant phenolic compounds. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 825–836. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1982-x>

- Sanches-Silva, A., Costa, D., Albuquerque, T. G., Buonocore, G. G., Ramos, F., Castilho, M. C., Costa, H. S. (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(3), 374–395. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.879215>
- Sanchez-Garcia, M. D., Lopez-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2010). Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(11), 528–536. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.008>
- Rivero S. (2012). “Estudio y aplicación de películas activas a base de quitosano”, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Sarley, A. (2011). Implications of Thermochromic Ink. *Graphic Communication*.
- Schmid, M., Held, J., Hammann, F., Schlemmer, D., & Noller, K. (2015). Effect of UV-Radiation on the Packaging-Related Properties of Whey Protein Isolate Based Films and Coatings. *Packaging Technology and Science*, 28(10), 883–899. <http://doi.org/10.1002/pts.2150>
- Seeboth, A., Löttsch, D., Ruhmann, R., & Muehling, O. (2014). Thermochromic Polymers—Function by Design. *Chemical Reviews*, 114(5), 3037–3068. <http://doi.org/10.1021/cr400462e>
- Sen, L., Hyun, K.-H., Kim, J.-W., Shin, J.-W., & Eom, K.-H. (2013). The Design of Smart RFID System with Gas Sensor for Meat Freshness Monitoring. <https://doi.org/10.14257/astl.2013.41.05>
- Shaked-Sachray, L., Weiss, D., Reuveni, M., Nissim-Levi, A., & Oren-Shamir, M. (2002). Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiologia Plantarum*, 114(4), 559–565
- Shankar, S., & Rhim, J.-W. (2015). Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. *Carbohydrate Polymers*, 130(August), 353–363. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.018>
- Shankar, S., Jaiswal, L., Aparna, R. S. L., & Prasad, R. G. S. (2014). Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility, and antimicrobial activity of gold, silver and gold silver alloy nanoparticles prepared from *Lansium domesticum* fruit peel extract. *Materials Letters*, 137, 75–78. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.08.122>
- Shankar, S., Tanomrod, N., Rawdkuen, S., & Rhim, J.-W. (2016). Preparation of pectin/silver nanoparticles composite films with UV-light barrier and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 842–849. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.107>
- Shankar, S., Teng, X., Li, G., & Rhim, J.-W. (2015b). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of gelatin/ZnO nanocomposite films. *Food Hydrocolloids*, 45, 264–271. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.001>
- Shukla, V., Kandeepan, G., & Vishnuraj, M. R. (2015). Evaluation of shelf life of buffalo meat in aerobic cold storage using physicochemical parameters. *Buffalo Bulletin*, 34(4).
- Silva-Pereira, M. C., Teixeira, J. A., Pereira-Júnior, V. A., & Stefani, R. (2015). Chitosan/corn starch blend films with extract from *Brassica oleraceae* (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 258–262. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.041>
- Silva-Weiss, A., Ihl, M., Sobral, P. J. a, Gómez-Guillén, M. C., & Bifani, V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200–216. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9072-5>
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K. P., & Rai, M. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*, 108(3), 233–237. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.017>
- Siqueira, M. C., Coelho, G. F., de Moura, M. R., Bresolin, J. D., Hubinger, S. Z., Marconcini, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2014). Evaluation of Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles for Carboxymethylcellulose Film Applications in Food Packaging. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, 5512–5517. <http://doi.org/10.1166/jnn.2014.8991>

- Smits, E., Schram, J., Nagelkerke, M., Kusters, R., Heck, G. Van, Acht, V. Van, Schoo, H. (2012). Development of printed RFID sensor tags for smart food packaging. 14th International Meeting on Chemical Sensors, 403–406. <https://doi.org/10.5162/IMCS2012/4.5.2>
- Smolander, M. (2008). Freshness Indicators for Food Packaging. Smart Packaging Technologies for Fast Moving Consumer Goods. <https://doi.org/10.1002/9780470753699.ch7>
- Smolander, M., Hurme, E., & Ahvenainen, R. (1997). Leak indicators for modified-atmosphere packages. Trends in Food Science & Technology, 8(4), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01017-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01017-0)
- Smolander, M., Hurme, E., Latva-Kala, K., Luoma, T., Alakomi, H.-L., & Ahvenainen, R. (2002). Myoglobin-based indicators for the evaluation of freshness of unmarinated broiler cuts. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 3(3). [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00043-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00043-7)
- Song, F., Tang, D.-L., Wang, X.-L., & Wang, Y.-Z. (2011). Biodegradable Soy Protein Isolate-Based Materials: A Review. Biomacromolecules, 12(10), 3369–3380. <https://doi.org/10.1021/bm200904x>
- Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., & Añón, M. C. (1995). Effects of Thermal Treatment of Soy Protein Isolate on the Characteristics and Structure-Function Relationship of Soluble and Insoluble Fractions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(9), 2471–2479. <https://doi.org/10.1021/jf00057a029>
- Sothornvit, R., & Krochta, J. (2005). Plasticizers in edible films and coatings. Innovations in Food Packaging, 403–433.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21), 6172–81.
- Stuchell, y. M., & Krochta, J. M. (1994). Enzymatic Treatments and Thermal Effects on Edible Soy Protein Films. Journal of Food Science, 59(6), 1332–1337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb14709.x>
- Su, J.-F., Huang, Z., Zhao, Y.-H., Yuan, X.-Y., Wang, X.-Y., & Li, M. (2010). Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. Industrial Crops and Products, 31(2), 266–276. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.11.010>
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. Biotechnology Advances, 25(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. a., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tapia-Blácido, D., Mauri, A. N., Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A. & Añón, M. C. (2007). Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. Journal of Food Sciences, 72 (5), 293-300.
- Temptime Corporation. <http://temptimecorp.com/>
- The Freedonia Group - Industry Market Research - Market Size, Market Share, Market Leaders, Demand Forecast, Sales, Company Profiles, Market Research, Industry Trends and Companies. <http://www.freedoniagroup.com/>
- Timestrip to attend the 2012 International Boston Seafood Show - Timestrip. <http://timestrip.com/timestrip-to-attend-the-2012-international-boston-seafood-show/>
- Toker, R. D., Kayaman-Apohan, N., & Kahraman, M. V. (2013). UV-curable nanosilver containing polyurethane based organic–inorganic hybrid coatings. Progress in Organic Coatings, 76(9), 1243–1250. <http://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.03.023>
- Tomihata, K., & Burczak, K. (1992). Cross-linking and biodegradation of native and denatured collagen. Polymers of Biological and Biomedical Significance. American Chemical Society, vol. 540, issue 540, 275-286.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T., & Nilsuwan, K. (2015). Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. Food Hydrocolloids, 48, 248–259. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.025>

- Torres-Arreola, W., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cárdenas-López, J. L., & Ezquerro-Brauer, J. M. (2007). Effect of a Low-Density Polyethylene Film Containing Butylated Hydroxytoluene on Lipid Oxidation and Protein Quality of Sierra Fish (*Scomberomorus sierra*) Muscle during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6140–6146. <https://doi.org/10.1021/jf070418h>
- Trezza, T. A., & Vergano, P. J. (1994). Grease Resistance of Corn Zein Coated Paper. *Journal of Food Science*, 59(4), 912–915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08156.x>
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., & Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289(1–2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.11.050>
- Ustunol, Z., y Mert, B. (2006). Water Solubility, Mechanical, Barrier, and Thermal Properties of Cross-linked Whey Protein Isolate-based Films. *Journal of Food Science*, 69(3), 129-133. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13365.x>
- Utsumi, S., & Matsumura, Yasuki and Mori, T. (1997). Structure-Function relationship of soy protein in Food proteins and their applications. Marcel Dekker.
- Valdés, A., Mellinas, A. C., Ramos, M., Burgos, N., Jiménez, a., & Garrigós, M. C. (2015). Use of herbs, spices and their bioactive compounds in active food packaging. *RSC Adv.*, 5(50), 40324–40335. <https://doi.org/10.1039/C4RA17286H>
- Van Tuil, R.; Fowler, P.; Lawther, M.; Weber C. J. (2000). Properties of biobased packaging materials. En: *Biobased packaging materials for the food industry: status and perspectives*. Ed. Weber, C. J. KVL: Frederiksberg, Dinamarca, pp. 13-44.
- Vanderroost, M., Ragaert, P., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. (2014). Intelligent food packaging: The next generation, 39(1), 47–62. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.009>
- Vanin, F. M., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2005). Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 899–907. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.003>
- Varela, P., & Fisman, S. M. (2011). Hydrocolloids in fried foods. A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1801–1812. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.016>
- Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F. W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N., & Dhanaraj, S. A. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 113–120. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.004>
- Veiga-Santos, P., Ditchfield, C., & Tadini, C. C. (2011). Development and evaluation of a novel pH indicator biodegradable film based on cassava starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(2), 1069–1079. <http://doi.org/10.1002/app.33255>
- Vera, María C., Núñez, F., A., & Méndez, J. (2012). Effect of the modified atmosphere packaging on the physicochemical characteristics of fillets of bagre (*Brachyplatystoma vaillanti*) during the storage. *Universidad de Oriente, Venezuela*, 25(3), 294–301.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10(3), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00032-1)
- Vermeiren, L., Heirlings, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2003). Oxygen, ethylene and other scavengers. *Novel Food Packaging Techniques*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-675-7.50007-9>
- Vieira, F. G., & Rozas, J. (2011). Comparative Genomics of the Odorant-Binding and Chemosensory Protein Gene Families across the Arthropoda: Origin and Evolutionary History of the Chemosensory System. *Genome Biology and Evolution*, 3(0), 476–490. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr033>
- Vinod, V. T. P., Saravanan, P., Sreedhar, B., Devi, D. K., & Sashidhar, R. B. (2011). A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 291–298. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.11.035>

- Vinson, J. R., & Sierakowski, R. L. (n.d.). Introduction To Composite Materials. In *The Behavior Of Structures Composed Of Composite Materials* (pp. 1–38). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-48414-5_1
- VisTab. <http://www.vistab.co.nz/>
- Von Bültzingslöwen, C., McEvoy, A. K., McDonagh, C., MacCraith, B. D., Klimant, I., Krause, C., & Wolfbeis, O. S. (2002). Sol-gel based optical carbon dioxide sensor employing dual luminophore referencing for application in food packaging technology. *Analyst*, 127(11). <https://doi.org/10.1039/b207438a>
- Wagner J. R., Sorgentini D. A., & Añón M. C. (1996). Thermal and Electrophoretic Behavior, Hydrophobicity, and Some Functional Properties of Acid-Treated Soy Isolates. <https://doi.org/10.1021/JF950444S>
- Wang, S., Marcone, M., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). The Impact of Anthocyanin-Rich Red Raspberry Extract (ARRE) on the Properties of Edible Soy Protein Isolate (SPI) Films. *Journal of Food Science*, 77(4), 497–505. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02655.x>
- Wang, Y., Guo, X., Pan, R., Han, D., Chen, T., Geng, Z., Chen, Y. (2015). Electrodeposition of chitosan/gelatin/nanosilver: A new method for constructing biopolymer/nanoparticle composite films with conductivity and antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, 53, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.031>
- Wang, Y., Rakotonirainy, A. M., & Padua, G. W. (2003). Thermal Behavior of Zein-based Biodegradable Films. *Starch - Stärke*, 55(1), 25–29. <https://doi.org/10.1002/star.200390002>
- Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-Y., & Lin, J.-K. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(12), 1867–1876. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)02024-9](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)02024-9)
- Wanihsuksombat, C., Hongtrakul, V., & Suppakul, P. (2010). Development and characterization of a prototype of a lactic acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality. *Journal of Food Engineering*, 100(3). <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.027>
- Watkins C.B. (2006). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24: 389–409
- Wei, Z., Wang, J., & Ye, L. (2011). Classification and prediction of rice wines with different marked ages by using a voltammetric electronic tongue. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.046>
- Wessling, C., Nielsen, T., Leufvén, A., & Jägerstad, M. (1998). Mobility of α -tocopherol and BHT in LDPE in contact with fatty food simulants. *Food Additives and Contaminants*, 15(6), 709–715. <https://doi.org/10.1080/02652039809374701>
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., & Topolska, J. (2015). Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food Chemistry*, 167, 115–123. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.087>
- Willetts, K. A. (2014). Plasmon point spread functions: How do we model plasmon-mediated emission processes *Frontiers of Physics*, 9(1), 3–16. <http://doi.org/10.1007/s11467-013-0356-2>
- Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 969–976. <https://doi.org/10.1021/jf60172a025>
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 423–428. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>
- Wrolstad, R. E., Giusti, M. M., & Kalt, W. (1993). Anthocyanins. Printed Edition of the Special Issue Published in *Molecules*. MDPI.
- Wrolstad, R. E., Giusti, M. M., Rodriguez-saona, L. E., & Durst, R. W. (2001). Anthocyanins from Radishes and Red-Fleshed Potatoes, 66–89.

- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., McKay, S., Nakajima, J., Tanaka, I., Saito, K. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(5), 7846–7856. <http://doi.org/10.1155/S1110724304404045>
- Yam, K. L., & Lee, D. S. (2012). *Emerging Food Packaging Technologies : Principles And Practice*. Elsevier Science.
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., & Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: Concepts and applications. *Journal of Food Science*, 70(1).
- Yildirim, M., y Hettiarachchy, N. S. (2008). Properties of Films Produced by Cross-linking Whey Proteins and 11S Globulin Using Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63(2), 248–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15719.x>
- Yoksan, R., & Chirachanchai, S. (2010). Silver nanoparticle-loaded chitosan-starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering C*, 30(6), 891–897. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.004>
- Yoshida, C. M. P., Maciel, V. B. V., Mendonça, M. E. D., & Franco, T. T. (2014). Chitosan biobased and intelligent films: Monitoring pH variations. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1). <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.015>
- Youssef, A. M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., & Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.016>
- Zabala, S., Castán, J., & Martínez, C. (2015). Development of a time-temperature indicator (TTI) label by rotary printing technologies. *Food Control*, 50, 57–64. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.007>
- Zayas, J. F. (1997). Solubility of Proteins. In *Functionality of Proteins in Food* (pp. 6–75). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59116-7_2
- Zhang, H., & Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 29(2), 203–220. <http://doi.org/10.1002/ep.10463>
- Zhao, R., Torley, P., & Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 43(9), 3058–3071. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-2434-8>
- Zhao, S., Yao, J., Fei, X., Shao, Z., & Chen, X. (2013). An antimicrobial film by embedding in situ synthesized silver nanoparticles in soy protein isolate. *Materials Letters*, 95, 142–144. <http://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.12.106>