

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural



**FILMS BIODEGRADABLES ACTIVOS DE
ALMIDON-GELATINA. EFECTO DE LA
OXIDACIÓN DEL ALMIDÓN**

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Trabajo de final de grado

Autor:

Julián Cárdenas Estela

Directora académica:

Amparo Chiralt Boix

Lorena Atarés Huerta

Directora Experimental:

Olga Moreno Marro

Valencia, Julio 2016

FILMS BIODEGRADABLES ACTIVOS DE ALMIDON-GELATINA. EFECTO DE LA OXIDACIÓN DEL ALMIDÓN

Julián Cárdenas Estela, Olga Moreno Marro, Amparo Chiralt Boix, Lorena María Atares

7 de Julio, Valencia

RESUMEN

Se elaboraron películas biodegradables de almidón de maíz oxidado, gelatina bovina y glicerol como plastificante, donde se incorporó el agente activo etil lauroil arginato (LAE). Las películas se obtuvieron por extensión y secado (casting) y se caracterizaron sus propiedades físicas (microestructura, mecánicas, barrera, ópticas, humedad de equilibrio, migración total en simulantes alimentarios y solubilidad en agua). Se observó una estructura estratificada a causa de la diferencia de densidad entre el almidón y la proteína, mientras que la incorporación de LAE favoreció una mayor homogeneidad y propició la aparición de pequeñas burbujas de aire a causa de su carácter tensoactivo. Con oxidación total, debido al mayor grado de entrecruzado, los films fueron más rígidos y menos extensibles, mientras que con oxidación parcial se observó el efecto contrario, atribuible a heterogeneidades en las cadenas. En general la adición de LAE supuso un descenso de los valores de esfuerzo. La oxidación del almidón tuvo como consecuencia la reducción de la humedad de equilibrio, la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, coherentemente con la mayor hidrofobicidad de la matriz. Las películas con almidón oxidado presentaron coloraciones pardas atribuibles a productos de Maillard, que también se liberaron en presencia de LAE. La oxidación del almidón redujo considerablemente la migración en ácido acético y la capacidad de hinchamiento en agua destilada, coherentemente con el entrecruzado de la matriz.

Palabras clave: Films biodegradables, almidón de maíz oxidado, gelatina bovina, LAE.

ABSTRACT

Biodegradable films were prepared using oxidized corn starch, bovine gelatin and glycerol as a plasticizer, with the incorporation of ethyl lauroyl arginate (LAE). The films were obtained by casting, and their physical properties (microstructure, mechanical, barrier, optical, equilibrium moisture content, overall migration in food simulants and water solubility) were characterized. A layered structure was observed as related to the density gradient between starch and protein, whereas LAE incorporation favored film homogeneity and caused the appearance of small air bubbles due to its surfactant character. Films with fully oxidized starch were more rigid and less extensible due to the higher degree of crosslinking. On the other hand, the opposite effect was observed in films with partially oxidized starch, due to heterogeneities in the polymer chains. In general, the addition of LAE caused a decrease of stress values. Oxidation of starch increased the hydrophobic character of the matrix, thus causing a reduction in the equilibrium moisture and permeabilities to both water and oxygen. Films with oxidized starch presented browning, attributable to Maillard products, which are also present with LAE. Oxidation of starch considerably reduced both film migration in acetic acid and swellability in distilled water, as consequence of the crosslinked matrix.

Keywords: Biodegradable films, oxidized corn starch, bovine gelatin, LAE.

ÍNDICE

1. Introducción

1.1 Materiales biodegradables para el envasado de alimentos

1.2 El almidón en la obtención de materiales para el envasado de alimentos

1.3 Fuentes y estructura del almidón

1.4 Métodos de obtención de películas de almidón

1.5 Películas de almidón obtenidas por casting

1.6 Obtención de películas de almidón por termoprocesado

1.7 Propiedades de las películas de almidón

1.8 Propiedades del almidón oxidado

1.9 Films mixtos almidón-gelatina

1.10 Incorporación de agentes antimicrobianos a los films

1.11 Propiedades del LAE como antimicrobiano

1.12 Objetivos del estudio

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

2.2 Oxidación del almidón

2.3 Obtención de las películas

2.4 Caracterización microestructural y física de las películas

2.4.1 Microestructura

2.4.2 Propiedades Mecánicas

2.4.3 Humedad y Propiedades barrera

2.4.4 Propiedades ópticas: transparencia y color

2.4.5 Migración total en simulantes alimentarios y solubilidad en agua

2.5 Análisis Estadístico

3 Resultados y discusión

3.1 Microestructura de los films

3.2 Propiedades mecánicas de las películas

3.3 Humedad y propiedades barrera de las películas

3.4 Propiedades ópticas

3.5 Solubilidad en agua y migración total en simulantes alimentarios.

4 Conclusiones

5 Referencias

1. Introducción.

En la actualidad, la mayoría de los envases de productos alimentarios son producidos a partir de materiales poliméricos derivados del petróleo no biodegradables (Saiah et al., 2009). Entre ellos, los más utilizados son el polipropileno (PP) y polietileno (PE), con un 22 y 37% de la demanda mundial. Estos envases cumplen con la finalidad de conservar y proteger a los alimentos de daño físico, oxidaciones y alteraciones microbiológicas, pero su uso masivo se está convirtiendo en un serio problema medioambiental, teniendo el uso alimentario un gran peso respecto al total de sectores productivos (Azeredo, 2009). La figura 1.1 muestra el aumento exponencial de la producción de plásticos a nivel mundial y europeo.

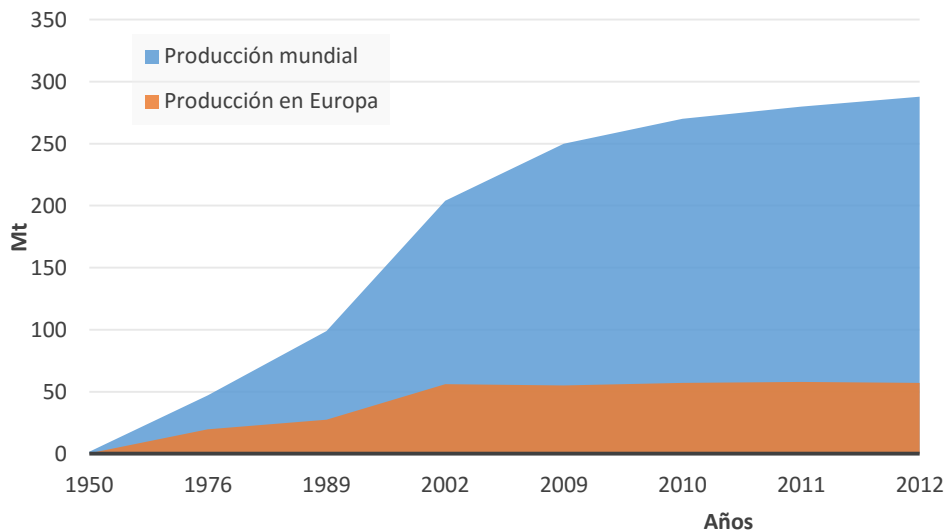


Figura 1.1. Evolución de la producción de plásticos a nivel mundial y en Europa. Fuente: PlasticsEurope PEMRG.

Se puede observar que este aumento en Europa no ha sido tan elevado en comparación con la media mundial debido a la incorporación de un gran número de países, antes emergentes, a la producción mundial. La sustitución parcial o total de estos materiales plásticos por polímeros biodegradables provenientes de fuentes renovables podría reducir el impacto que tiene actualmente la producción de plásticos en el medioambiente (Andrade-Molina et al., 2013), siendo éste uno de los temas que requiere todavía los esfuerzos de investigación de académicos y empresas para adecuar los nuevos materiales a los usos requeridos.

1.1 Materiales biodegradables para el envasado de alimentos

En la actualidad se han desarrollado un gran número de bioplásticos o plásticos biodegradables tanto a partir de fuentes renovables como de síntesis. Entre estos polímeros destacan los obtenidos a partir de hidroxibutirato y hidroxivalerato, que son producidos en la naturaleza durante la biosíntesis. Otros materiales biodegradables son polímeros provenientes del almidón o celulosa que se suelen usar mezclándolos con polímeros sintéticos (Halina Kaczmarek, 2003). También se han desarrollado materiales nanocompuestos que presentan buenas propiedades mecánicas, de barrera y térmicas entre otras.

Entre los biopolímeros, el almidón es destacable por su gran disponibilidad y bajo coste en el mercado (Moreno et al., 2014 Wilhelm et al., 2003; Barnett, 2011). Tras su termoprocesado en presencia de plastificantes, el almidón presenta propiedades termoplásticas muy similares a la de los plásticos sintéticos, lo cual posibilita la obtención de películas que pueden actuar como barrera al ambiente externo, protegiendo los productos alimenticios y contribuyendo a alargar su vida útil. La obtención de estas películas implica, además de los agentes formadores de las mismas, el uso de solventes y plastificantes entre otros (Leites, 2015). Además, algunos compuestos pueden añadirse durante la formación del film para proporcionar propiedades antioxidantes y antimicrobianas al material, permitiendo la obtención de los llamados materiales activos para el envasado, que permiten aumentar la estabilidad del alimento y su vida útil. La aplicación de los films biodegradables como cobertura de alimentos está siendo investigada en su capacidad de retardar la transferencia de humedad, gases, lípidos etc...

1.2 El almidón en la obtención de materiales para el envasado de alimentos.

El almidón es un material polimérico muy abundante en la naturaleza. Representa más de un 60% de la composición de los granos de cereales y se puede separar fácilmente de los otros componentes (Arvanitoyannis y Kassaveti 2009). Tanto los almidones nativos como los modificados juegan un papel importante en la industria alimentaria, ya que pueden ser utilizados para adecuar las propiedades físicas de los productos alimenticios (salsas, sopas etc....) y

modificar su textura. Además, es destacable su capacidad de formación de geles y propiedades filmógenas. Los gránulos de almidón no son solubles en agua fría debido a los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas de amilosa y amilpectina en el gránulo nativo. Sin embargo, cuando el almidón se calienta en agua, la estructura cristalina se ve afectada y las moléculas de agua interaccionan con los grupos hidroxilo de las cadenas, tanto de amilopectina como amilosa, provocando la parcial solubilización del almidón (Hoover, 2001). Calentar suspensiones de almidón en un exceso de agua hasta temperaturas del orden de 65-100 °C provoca un proceso irreversible de gelatinización. Esto es necesario para obtener una solución homogénea formadora de película. La gelatinización consta de varias fases: la hidratación del gránulo, la difusión del solvente dentro de los gránulos de almidón, la fusión de las zonas cristalinas de los polímeros y la solubilización parcial e hidratación de las cadenas (Donovan, 1979; Liu et al., 1991; Jenkins and Donald, 1998).

1.3 Fuentes y estructura del almidón

Cereales y tubérculos como maíz, patata, trigo, sorgo o yuca, entre otros, presentan un contenido entre el 30 y el 70% de almidón en su composición polimérica y son fuentes naturales de este polímero que puede usarse en su estado nativo o modificado.

El almidón nativo está compuesto por dos principales componentes macromoleculares: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de α -1,4 unidades de glucosa que tiene una excelente capacidad de formación de films fuertes, isotrópicos, inodoros, insípidos e incoloros (Campos et al., 2011). Por otro lado, la amilopectina es un polímero altamente ramificado de cadenas α -1,4 unidas de glucosa con puntos de ramificación α -1,6 glucosídicos que ocurren cada 25-30 unidades de glucosa (Durraniy Donald, 1995; Liu 2005). Físicamente, los almidones nativos adoptan la forma de gránulos, donde tanto la amilosa y la amilopectina están estructuradas por enlaces de hidrógeno, que contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternas (Jenkins et al. 1993). Los almidones nativos mayoritariamente son semi-cristalinos, con una cristalinidad de aproximadamente 20-45% (Whistler et al. 1984). La amilosa y los puntos de ramificación de amilopectina forman las regiones amorfas mientras

que las cadenas cortas ramificadas en la amilopectina son los principales componentes cristalinos en el almidón granular. Los almidones pueden diferenciarse entre sí por su contenido de amilosa y amilopectina, que dependen de la fuente de la que se extraen (Bemiller y Whistler, 2009; Bertolini, 2009).

1.4 Métodos de obtención de películas de almidón

La obtención de películas de almidón implica la desestructuración de los gránulos y la liberación de los polímeros, a fin de que puedan reorganizarse sus cadenas de una forma ordenada capaz de formar una matriz polimérica con adecuadas propiedades mecánicas y funcionales. Esto puede conseguirse mediante procesado en húmedo (extensión y secado de dispersiones formadoras de película: *casting*) o termoprocesado de almidón en presencia de plastificantes, principalmente glicerol (procesado termoplástico).

1.5 Películas de almidón obtenidas por casting

El método de casting consiste en la formación de una película por medio la extensión y secado de una dispersión del polímero que contiene además el resto de componentes como los plastificantes. Este método es el más comúnmente utilizado para la obtención de recubrimientos, aplicando la dispersión directamente sobre el producto con el posterior secado. Para la obtención de films por casting, la dispersión del polímero se vierte en una placa nivelada (Bertuzzi et al., 2007; Jiménez et al., 2012) para proceder a su secado y obtener los films. El proceso para los films de almidón comprende varias etapas: gelatinización, dispersión, homogenización de la mezcla, extensión y secado. La etapa inicial de gelatinización del almidón es necesaria cuando se utiliza almidón nativo para liberar los polímeros de la estructura del grano. La optimización del proceso depende del origen del almidón, ya que la estructura del gránulo viene determinada por la fuente de almidón (Torres et al., 2005). Por tanto, esta etapa puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas, dependiendo del tipo de almidón (Ratnayake y Jackson, 2007; Ronda y Roos, 2008) y del contenido de plastificante (Tan et al., 2004). Tras la gelatinización tiene lugar la homogenización, dependiente de los componentes añadidos a la dispersión de

almidón. Finalmente, la extensión de la dispersión formadora de film sobre una superficie nivelada bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, permite el secado y formación del film. Los films son posteriormente extraídos de las placas para las que se han utilizado diferentes materiales como poliestireno (Han et al. 2006; Paes et al. 2008), polietileno (García et al. 2000a; Osés et al. 2009b) o politetrafluoretileno (Teflon) (Talja et al. 2007; Reddy and Yang 2010; Jiménez et al. 2012). Se han utilizado también diferentes condiciones de secado para la obtención de films, que normalmente afectan a sus propiedades por lo que deben ser controladas.

1.6 Obtención de películas de almidón por termoprocesado.

Los llamados métodos “en seco” se basan en un tratamiento termoplástico. A pesar de que el almidón nativo no es un material termoplástico, puede ser procesado como tal si se lleva a cabo en condiciones adecuadas. Carvalho (2008) describe el TPS (almidón termoplástico) como un material amorfo o semicristalino compuesto de almidón gelatinizado o desestructurado que contiene un plastificante o una mezcla de ellos. El TPS puede ser repetidamente ablandado y endurecido de modo que pueda ser moldeado por la acción de fuerzas de cizallamiento y de calor, lo que permite llevar a cabo su procesamiento con las técnicas comúnmente usadas en la industria del plástico. El almidón puede ser procesado térmicamente por extrusión de película, extrusión de espuma, inyección, moldeo por compresión y extrusión reactiva. Algunas de estas técnicas son generalmente utilizadas con el almidón en combinación tanto con biopolímeros como con derivados del petróleo (Fishman et al 2000; Kim Lee 2002; Frost et al. 2011). El proceso de gelatinización depende principalmente del contenido en agua y de las condiciones de temperatura. Mediante fuerzas de cizalla se puede lograr la gelatinización a bajos contenidos de agua debido a la alta presión aplicada que desestructura los gránulos de almidón, favoreciendo la transferencia de agua a las moléculas del interior del gránulo. Este proceso térmico produce cambios físicos en los biopolímeros de almidón: difusión de agua, expansión del gránulo, fusión de zonas cristalinas y gelatinización.

1.7 Propiedades de las películas de almidón.

Las películas de almidón presentan buenas propiedades ópticas, son transparentes e incoloras, y tienen muy buenas propiedades de barrera al oxígeno, lo cual es interesante para la conservación de alimentos. Por otro lado, pero son altamente sensibles a la humedad por su carácter polar, lo que confiere cambios notables en sus propiedades mecánicas y de barrera en función de la humedad relativa ambiental. También presentan cambios en sus propiedades con el tiempo, debido a la progresiva agregación de sus cadenas que tienden a formar puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo. Estas agregaciones, en el caso de la amilosa, conllevan la formación de zonas cristalinas. Todo este hace a los films de almidón muy rígidos con el tiempo, perdiendo flexibilidad. El alto carácter higroscópico del almidón, les confiere también a los films muy pobres propiedades de barrera frente al vapor de agua, y a cambios relevantes en sus propiedades en contacto con alimentos de alta humedad, lo que limita su uso práctico. La tabla 1.1 presenta de forma comparada los valores de las propiedades mecánicas de films de plásticos convencionales con los de un material comercial totalmente biodegradable a base principalmente de almidón de maíz (Mater-Bi) y un poliéster alifático-aromático sintético, donde puede observarse la menor extensibilidad y resistencia de los materiales de almidón en comparación con los plásticos convencionales.

Tabla 1.1 Módulo de elasticidad, tensión y fractura y extensibilidad de diferentes plásticos sintéticos (HDPE, PET y PP) y de almidón (Mater-Bi).

Propiedades mecánicas	HDPE (Harper, 2004)	PET (Harper, 2004)	PP (Yam, 2009)	Mater-Bi (Petersen et al, 2001)
Módulo de elasticidad (MPa)	862	159	81.4	-
Tensión de fractura (MPa)	21-52	9960	2760	18± 2
Extensibilidad (%)	10-500	30-300	35-475	6 ± 0

En cuanto a las propiedades barrera, las películas de almidón superan ampliamente a los plásticos convencionales en capacidad barrera al oxígeno y a gases, pero su alto carácter hidrofílico le confiere muy bajo poder barrera al vapor de agua. Estas debilidades de los films de almidón como material de envase alimentario han obligado al desarrollo de modificaciones que permitan adaptar sus propiedades a los requerimientos del envasado alimentario, y aprovechar su bajo coste, disponibilidad, biodegradabilidad y compatibilidad para el contacto con alimentos. Se han investigado diferentes estrategias de mejora:

- Modificación química del almidón: esterificación, eterificación, acetilación, hidroxipropilación o la oxidación (López et al, 2013; Olsson et al., 2014).
- Mezcla con otros biopolímeros más o menos compatibles, como quitosano, quitina, hidroxipropil metilcelulosa o gelatina.
- Incorporación de nanopartículas orgánicas o inorgánicas, entre otros (Azeredo, 2009).

1.8 Propiedades del almidón oxidado

Entre los distintos métodos para modificar el almidón, se puede recurrir a su oxidación, y más específicamente la división oxidativa, con peryodato, del enlace C2-C3 de la anhidroglucosa del almidón nativo (Martucci & Ruseckaite, 2009). La oxidación del almidón puede llevarse a cabo a temperatura y pH adecuados mediante una gran variedad de agentes oxidantes. Mediante la oxidación del almidón con peryodato, se introducen grupos funcionales carbonilo o carboxilo en las cadenas de almidón que favorecen su entrecruzado (*cross-linking*) y limitan el establecimiento de puentes de hidrógeno entre los grupos OH de las cadenas y las moléculas agua, aportando un carácter más hidrofóbico al producto. Esto podría suponer una mejora en sus propiedades barrera el vapor de agua, limitando la capacidad de adsorción de agua por parte del film. Además, una matriz más reticulada supondrá también una mejora de las propiedades mecánicas y la capacidad barrera tanto al oxígeno como al vapor de agua (Martucci & Ruseckaite, 2009). Al almidón oxidado en esta forma se le denomina DAS (*dialdehyde starch*). En la Figura 1.2 se ilustra la reacción de oxidación, con

la formación de dialdehidos (Le Song et al., 2011) y, en la Figura 1.3 las reacciones de entrecruzado mediante formación de acetales entre carbonilos e hidroxilos (Du et al. 2008).

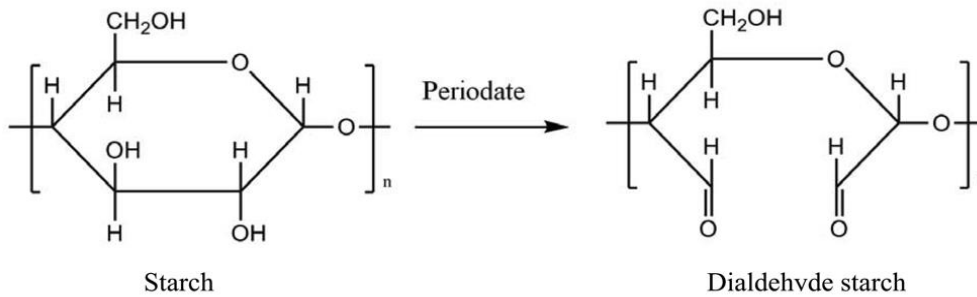


Figura 1.2 Oxidación del almidón

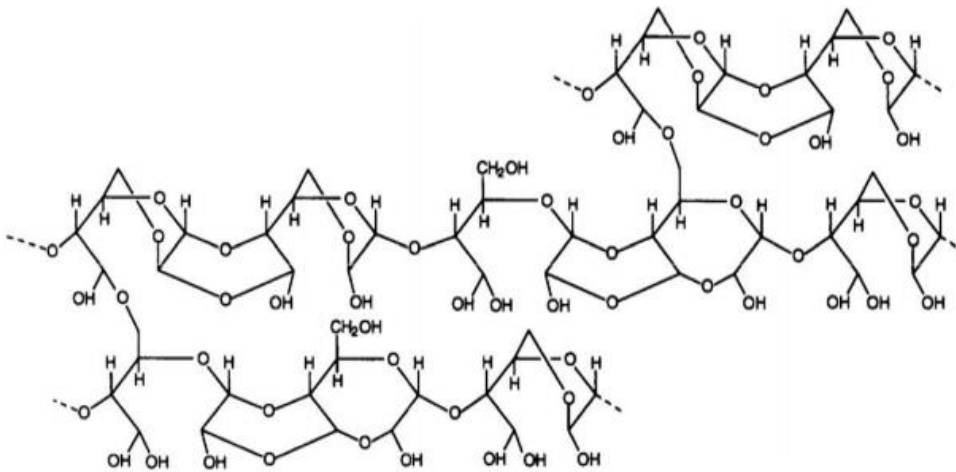


Figura 1.3 Cadenas entrecruzadas mediante formación de uniones acetalicas entre carbonilos y oxhidrilos (Du et al. 2008).

El uso alimentario de DAS no está permitido, por inducir la reticulación de las cadenas de polipéptidos y globulinas (Schwenke, Prah, Gymratz, Ender, Uhlig y Volnova, 1976) a través de la reacción de condensación de grupos carbonilo con los grupos amino proteicos. Sin embargo, su potencial como componente de plásticos biodegradables para fines de envasado radica precisamente en esta capacidad de entrecruzar con proteínas para dar films con mejores propiedades. Estudios previos con este almidón oxidado (Rhim et al., 1998) han puesto de manifiesto un aumento en el módulo de elasticidad (rigidez), tensión de fractura (resistencia) del material y extensibilidad cuando se incorporó un 5 % de DAS en

films de proteína de soja. Por otro lado, la solubilidad en agua disminuyó de manera considerable a medida que el porcentaje de DAS aumentó, lo cual es indicador de la reticulación de la estructura.

1.9 Films mixtos almidón-gelatina.

Como se ha comentado previamente, otra de las posibles estrategias para mejorar las propiedades del almidón se basa en su combinación con otros biopolímeros. Diferentes autores han estudiado la combinación del almidón con gelatina, observando cómo diferentes proporciones de ambos polímeros permiten modular la resistencia y extensibilidad de los films (Al-Hassan and Norziah, 2012; Fakhoury et al., 2012). También se observó que la incorporación de gelatina a films de almidón de yuca les confiere una mayor dureza y resistencia a la fractura y extensibilidad, particularmente en la proporción 1:1 (Acosta et al., 2015). Sin embargo, en comparación con los films sintéticos comerciales, los films mixtos almidón-gelatina siguen presentando propiedades mecánicas limitadas, altos valores de permeabilidad al vapor de agua y una elevada solubilidad en agua, (Fakhoury et al., 2012). Esto se ha atribuido al posicionamiento de moléculas de gelatina entre las cadenas de almidón aumentado su volumen libre, y facilitando la difusión del agua. No obstante, también puede estar relacionado con el aumento de la polaridad del film tras la adición de gelatina (Davanço et al., 2007).

1.10 Incorporación de agentes antimicrobianos a los films

La incorporación a los films de envasado de sustancias con actividad antimicrobiana permite reducir la utilización de aditivos conservantes en el propio alimento, a la vez que éstos pueden actuar de forma efectiva en la superficie de un producto sólido, donde se da mayoritariamente la posible contaminación. De este modo, los films se convierten en films activos. Algunos estudios reportan la adición de proteínas antimicrobianas como la lactoferrina y la lisozima a films de almidón para potenciar su carácter antimicrobiano. Estos compuestos afectaron a la estructura del film y sus propiedades funcionales pero disminuyeron el recuento de coliformes en comparación con un film control sin antimicrobianos (Moreno et al. 2015). También se ha estudiado el poder antimicrobiano del LAE

(N- α -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride) adicionado a films almidón gelatina (Moreno et al., 2016), observando un potente efecto antilisteria en ensayos *in vitro*, pero con una liberación muy rápida en sistemas alimentarios polares.

1.11 Propiedades del LAE como antimicrobiano

El LAE (Figura 1.4) es un surfactante catiónico derivado de la condensación del ácido láurico, L-arginina y etanol, que posee un amplio espectro antimicrobiano (Beltran et. al United States Patent, 2011). Es considerado GRAS (Generally Recognized as Safe) y aditivo alimentario por la FDA (Food and Drug Administration). El LAE tiende a concentrarse en la fase acuosa, donde se produce mayoritariamente la acción bacteriana. Además, muestra una elevada estabilidad química en un intervalo de pH entre 3 y 7, comprendiendo así a la gran mayoría de alimentos. Gracias a estas cualidades, puede ser utilizado en menor concentración que otros conservantes alimentarios equivalentes, lo que lo hace interesante para su incorporación como agente activo en películas biodegradables (Higueras et al., 2013). En los alimentos se ha incorporado LAE para reducir eficazmente los niveles iniciales de microorganismos, pero a menudo se ha observado una adaptación de las células que conduce a una recuperación total de la actividad microbiana anterior al uso de LAE en el alimento (Stopforth et al., 2010).

Diversos estudios han mostrado que el LAE actúa principalmente sobre la membrana externa y citoplasmática de los microorganismos (Bakal & Diaz, 2005). Además, se ha estudiado su metabolismo en ratas, mostrando una rápida absorción y metabolización en forma de aminoácidos y ácido láurico, que eventualmente se excreta en forma de dióxido de carbono y urea. Estudios toxicológicos han demostrado que el LAE es completamente inofensivo para animales y seres humanos. Otra de las características relevantes del compuesto es su poder tensoactivo (Ruckman et al., 2004), que le aporta la capacidad de reducir la tensión interfacial y favorecer determinadas mezclas.

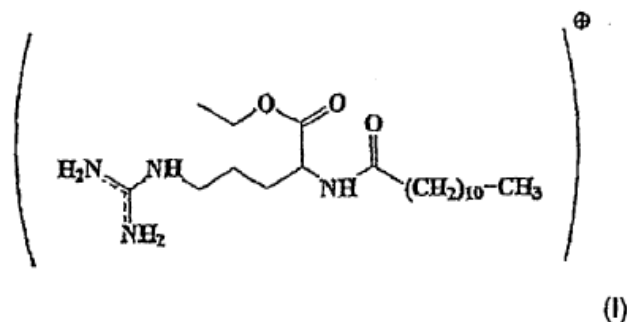


Figura 4. Estructura química del LAE

1.12 Objetivos del estudio

El presente estudio se enmarca en un proyecto más amplio donde se plantea una estrategia basada en mezclas almidón-gelatina, para mejorar las propiedades de films de almidón, en la obtención del films biodegradables activos, utilizando LAE como antimicrobiano. Dado que estudios previos han puesto de manifiesto una liberación muy rápida del activo hacia simulantes alimentarios para los films almidón-gelatina, se plantea como mejora el fomento del entrecruzado de la matriz polimérica a través de la reacción carbonilo-amino, utilizando almidón oxidado (3.4 di-aldehído, DAS) en lugar de almidón nativo. De esta forma se pretende reducir el carácter hidrofílico de las películas, posiblemente mejorando sus propiedades barrera frente al vapor de agua, limitando su capacidad de absorción de agua, su solubilidad en medio acuoso y la cinética de liberación del activo al alimento, fomentando una acción más sostenida en el tiempo.

Con el fin de evaluar las ventajas potenciales del almidón oxidado frente al no oxidado en films compuestos activos con gelatina, el objetivo global del estudio es la obtención de films biodegradables basados en gelatina, DAS, glicerol y LAE, mediante la técnica de extensión y secado y caracterización de sus

propiedades funcionales para el envasado de alimentos: barrera al vapor de agua y al oxígeno, propiedades mecánicas y ópticas.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtención y caracterización de almidón oxidado (DAS)
- 2) Obtención de films activos DAS-gelatina con glicerol como plastificante y LAE como antimicrobiano mediante extensión y secado (*casting*).
- 3) Caracterización de las propiedades funcionales de los films en términos de sus propiedades barrera, comportamiento mecánico, afinidad por el agua y migración global en simulantes alimentarios.
- 4) Comparación de estas propiedades con las previamente descritas para films de composición similar pero con almidón no oxidado.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para la obtención de las películas se utilizó: Almidón de maíz (Roquette Laisa España, S.A.); Gelatina bovina de tipo A (Sancho de Borja, S.L., Zaragoza); Peryodato de sodio (NaIO_4) (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania); Etil lauroil arginato (LAE) al 10% en etanol (Vedeqsa, Grupo Lamirsa, Terrassa, España) y glicerol como agente plastificante (Panreac Química S.A., Castellar de Vallès, Barcelona). Para el acondicionamiento de las películas obtenidas se utilizó nitrato de magnesio o pentóxido de fosforo, ambos de Panreac Química S.A (Castellar del Vallés, Barcelona).

2.2 Oxidación del almidón

El almidón de maíz fue oxidado según una modificación del método descrito por Wang et al., 2015, utilizando periodato sódico como oxidante, el cual reacciona con las unidades de glucosa que forman las cadenas de almidón. Se obtuvieron dos dispersiones de almidón en agua destilada al 10%, y se añadió peryodato sódico en proporción molar de peryodato sódico respecto a la glucosa de 0,5 (oxidación parcial: OR-0,5) y 1 (oxidación total: OR-1). Estas dispersiones se

mantuvieron en agitación magnética constante en oscuridad, a 35°C y pH 3,5. Transcurridas 4 h de reacción, se filtraron a vacío para detener la reacción. El polvo obtenido se lavó dos veces con agua destilada mediante re-suspensión, utilizando un ultraturrax (Ultraturrax T25, Janke and Kunkel, Germany) a 8000 rpm durante 30 segundos, y posterior filtrado. El sólido finalmente obtenido se utilizó como almidón oxidado (OS) para la elaboración de las películas. La humedad del sólido se determinó por secado en estufa a vacío a 60°C y acondicionamiento en pentóxido de fósforo, para determinar el contenido total en sólidos y ajustar su proporción en las posteriores formulaciones.

2.3 Obtención de las películas

Se prepararon 4 formulaciones (Tabla 2.1) a base almidón oxidado y gelatina bovina en proporción másica 1:1, con glicerol como plastificante (25% p/p con respecto a la masa total de polímero). El almidón oxidado fue de dos tipos (oxidación total o parcial), por lo tanto se obtuvieron dos formulaciones control en función del ratio de oxidación del almidón, OR-0,5 y OR-1. Por otro lado, se adicionó LAE como compuesto antimicrobiano, a las dispersiones formadoras de film, en una proporción másica de 0,1g de LAE/g de polímero total, y se obtuvieron dos formulaciones activas, OR-0,5LAE y OR-1LAE. Los resultados obtenidos para estas cuatro formulaciones se compararon con los obtenidos en un estudio previo con similar diseño experimental, pero utilizando almidón nativo sin oxidar (OR-0 y OR-0 LAE). La tabla 2.1 muestra el total de las formulaciones comparadas.

Tabla 2.1. Proporciones másicas de los diferentes componentes en las formulaciones de las películas. (AM: almidón de maíz, GB: gelatina bovina)

Formulación	Ratio oxidación del almidón	AM	GB	Glicerol	LAE
OR-0 (*)	0	0,5	0,5	0,25	0
OR-05	0,5	0,5	0,5	0,25	0
OR-1	1	0,5	0,5	0,25	0
OR-0LAE (*)	0	0,5	0,5	0,25	0,1

OR-05LAE	0,5	0,5	0,5	0,25	0,1
OR-1LAE	1	0,5	0,5	0,25	0,1

(*)Formulaciones caracterizadas en un estudio previo: Moreno et al. 2016

Tras la oxidación del almidón, se pesó la masa necesaria de filtrado para obtener el OS seco necesario. Éste se dispersó en agua destilada al 2% (p/p) y se mantuvo en un baño termostático a 99.9 °C durante 1h, agitando manualmente cada 5 min, con fin de inducir la gelatinización. Transcurrido este tiempo, la dispersión se enfrió hasta temperatura ambiente en un baño de agua manteniendo una agitación constante. Paralelamente, se preparó una disolución al 2% (p/p) de gelatina y se mantuvo en agitación magnética suave a 40°C. Tras ajustar el peso de la disolución de gelatina, se adicionó a la dispersión de OS gelatinizado, junto con el glicerol, para obtener las dispersiones sin LAE. Tras esto, se adicionó LAE al 10% con respecto al polímero total con el fin de obtener las dispersiones con LAE. Todas las dispersiones se ajustaron en peso y se desgasificaron mediante una bomba a vacío (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Germany). Finalmente, se vertió la cantidad necesaria de cada dispersión en placas de teflón de 150mm de diámetro, manteniendo constante la masa de sólidos (1.5 g/placa). Las películas se secaron durante 48 h, bajo condiciones de humedad relativa y temperatura controladas (45%HR y 25°C). Las películas secas se retiraron de las placas y se acondicionaron durante una semana en desecadores a 53% HR, con disoluciones sobresaturadas de nitrato de magnesio, previamente a la caracterización.

2.4 Caracterización microestructural y física de las películas

2.4.1 Microestructura

Se obtuvieron imágenes transversales de las películas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) con un microscopio ZEISS®, modelo ULTRA 55 (Alemania), con un voltaje de 2kV y 4.5 mm de distancia de trabajo. Las muestras se acondicionaron en desecadores con P₂O₅ durante 48 h con el objetivo de eliminar el máximo su contenido en humedad. Previamente a la observación de la sección transversal, se criofracturaron en N₂

líquido. Las muestras se montaron sobre portas de cobre y se recubrieron con platino.

2.4.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se analizaron mediante una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra), de acuerdo con el método estándar ASTM D882. Se cortaron doce rectángulos (de 25 mm por 100 mm) para cada formulación y se acondicionaron al 53% de HR y 25 °C. Se determinó el espesor de cada muestra en cuatro puntos utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) antes de proceder con el ensayo. Se colocaron las muestras en las pinzas de ensayo (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación fueron 50 mm y 50 mm·min⁻¹ respectivamente. Se obtuvieron curvas de fuerza frente a distancia, que fueron convertidas a curvas de tensión (σ) frente a deformación de Hencky (ϵ_H). Se determinó los parámetros módulo de elasticidad o módulo de Young (EM, en MPa), tensión de fractura (TS, en MPa) y porcentaje de deformación en el punto de fractura (%E).

2.4.3. Humedad y propiedades barrera

El contenido en humedad se determinó mediante un método gravimétrico en dos etapas: secado en estufa de convección a 60°C durante 24h y almacenamiento en desecador con P₂O₅ hasta alcanzar una masa constante. Se realizaron seis repeticiones por cada formulación. Los resultados se expresaron en g agua / g de película seca.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas, se siguió una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95, según McHugh et al. (1993). Se cortaron seis muestras circulares de 3,5 cm de diámetro por formulación. Las muestras fueron acopladas sobre copas de aluminio (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) donde se adicionaron 5 ml de agua destilada. La cara de la película en contacto con el aire durante el secado se orientó hacia la parte exterior de la copa. El conjunto se aseguró con un anillo de goma y dos mordazas, y las copas se depositaron sobre soportes con ventiladores. Estos soportes se colocaron en desecadores de vidrio con

disolución saturada de nitrato de magnesio (HR 53%). Los desecadores se almacenaron a 25°C en estufa, y se monitorizó la pérdida de peso mediante una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante 24h. Finalmente, se midió el espesor de las películas en seis puntos con un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona).

La permeabilidad al oxígeno de las películas se midió según el método estándar ASTM D3985-05 (2005) con un equipo de medida de la transmisión de oxígeno (OX-TRAN, Oxtran System, Mocon, Mineapolis, USA). Las medidas se realizaron a una HR de 53%, con 50 cm² de superficie de muestra expuesta. Se realizaron dos réplicas por formulación. Se midió el espesor de cada muestra en seis puntos.

2.4.4 Propiedades ópticas: transparencia, color y brillo.

Se utilizó un espectrocolorímetro Minolta modelo CM-3600d (Minolta CO., Tokio) con el cual se obtuvieron los espectros de reflexión de las películas sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R_0) entre 400 y 700nm, así como el espectro del fondo blanco utilizado en las medidas anteriores (R_g). A partir de estos espectros se calcularon los espectros de transmitancia interna (T_i), indicador de la transparencia de las muestras, y R_∞ (reflectancia de una película de grosor infinito con espesor suficiente para que el efecto del fondo fuera nulo), utilizando la teoría de Kubelka - Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999). Se llevó a cabo el análisis de seis muestras por formulación. La medida fue realizada sobre la parte en contacto con el aire durante el secado. Por otro lado, se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIEL*a*b*, con los espectros de R_∞ , utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante D65. Con estas coordenadas se calcularon los valores de tono (h_{ab}^*), croma (C_{ab}^*).

2.4.5. Migración total en simulantes alimentarios y solubilidad en agua

Se midió la migración total en simulantes alimentarios de muestras de película acondicionadas al 53% HR. Cada muestra se puso en contacto con 50mL de simulante alimentario, manteniendo la relación 6 dm² de muestra/kg de simulante, de acuerdo con la legislación vigente (Commission Regulation (EU) No. 10/2011). Con objetivo de simular el contacto con todo tipo de alimentos, se

utilizaron diferentes simulantes alimentarios: simulante A, etanol 10 %(v/v), corresponde a alimentos hidrofílicos: simulante B, ácido acético 3% (w/v), se asimila a alimentos hidrofílicos de bajo pH, y simulante D2, isooctano, simula alimentos lipofílicos con grasas libres en su superficie. El contacto película-simulante se mantuvo durante 10 días a 20°C, tras lo cual se retiraron las películas y se evaporó los restos de simulantes a 100°C durante 12h. La masa final de residuos obtenidos tras el secado de cada simulante corresponde con el valor de migración global. Los resultados se expresaron como miligramos totales de constituyentes liberados por unidad de superficie de película (mg/dm²). Se realizaron dos repeticiones por muestra.

La solubilidad e hinchamiento de las películas se determinó de acuerdo con Balaguer et al. (2011). Muestras cuadradas de 3 cm de lado se acondicionaron inicialmente en desecadores con P₂O₅, con fin de eliminar su contenido en agua y poder determinar su masa (W_dⁱ). Cada muestra se introdujo en 10mL de agua destilada. El conjunto se agitó suavemente y se mantuvo a 25 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se retiraron y se eliminó el exceso de humedad para obtener el peso húmedo de las muestras hidratadas (W_w^f). El contenido total de agua absorbida por las muestras fue determinado mediante el acondicionamiento de las muestras en desecadores con P₂O₅ hasta alcanzar peso constante (W_d^f). La solubilidad o pérdida de peso (WL %) de las muestras, fue expresada en gramos de película perdidos / 100g de película seca inicial (Ecuación 3). La capacidad de hinchamiento o de captación de agua (ΔW) se expresó en gramos de agua ganados / 100 g de película seca inicial (Ecuación 4). Se realizaron tres repeticiones por formulación.

$$WL\% = \frac{W_d^i - W_d^f}{W_d^i} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\Delta W\% = \frac{W_w^f - W_d^f}{W_d^f} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

2.5 Análisis Estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el análisis de varianza (ANOVA), empleando Statgraphics Centurion XVI para Windows (Manugistics Corp., Rockville, Md.).

3. Resultados y discusión

3.1. Microestructura de las películas

La figura 3.1 muestra las imágenes FESEM de las películas mezcla almidón oxidado-gelatina, con diferente grado de oxidación del almidón, sin y con LAE. Su comparación con las obtenidas en estudios anteriores para mezclas similares con almidón no oxidado (Moreno et al. 2016), revela una mejor integración de los polímeros, sin una separación de fases tan marcada. No obstante, se aprecia también una ligera estratificación de componentes, atribuida a la separación por densidades de las fases líquidas ricas en almidón o proteína durante el secado de la película. La fase superior es más rica en proteína, con menor densidad y la fase inferior más rica en almidón, con mayor densidad. Las muestras con mayor grado de oxidación del almidón presentaron una superficie de fractura más quebradiza, lo cual es coherente con un mayor grado de entrecruzado de la matriz. La incorporación de LAE modificó sustancialmente la superficie de fractura de los films, impartiendoles mayor homogeneidad, a la vez que se observan pequeñas burbujas de gas en la matriz. Esto es, probablemente, debido al carácter tensoactivo del compuesto, que facilita la incorporación de aire durante la etapa de homogenización del formulado, y su dificultad de eliminación por la alta viscosidad del mismo. No obstante, tal como se observó en las películas con almidón no oxidado, el LAE parece compatibilizar los polímeros, inhibiendo la separación de fases durante la etapa de secado del film, ya que el corte transversal no refleja diferencias estructurales entre la zona superior e inferior del mismo. Por consiguiente, desde el punto de vista estructural, tanto la oxidación del almidón, como la incorporación de LAE tuvieron un efecto positivo.

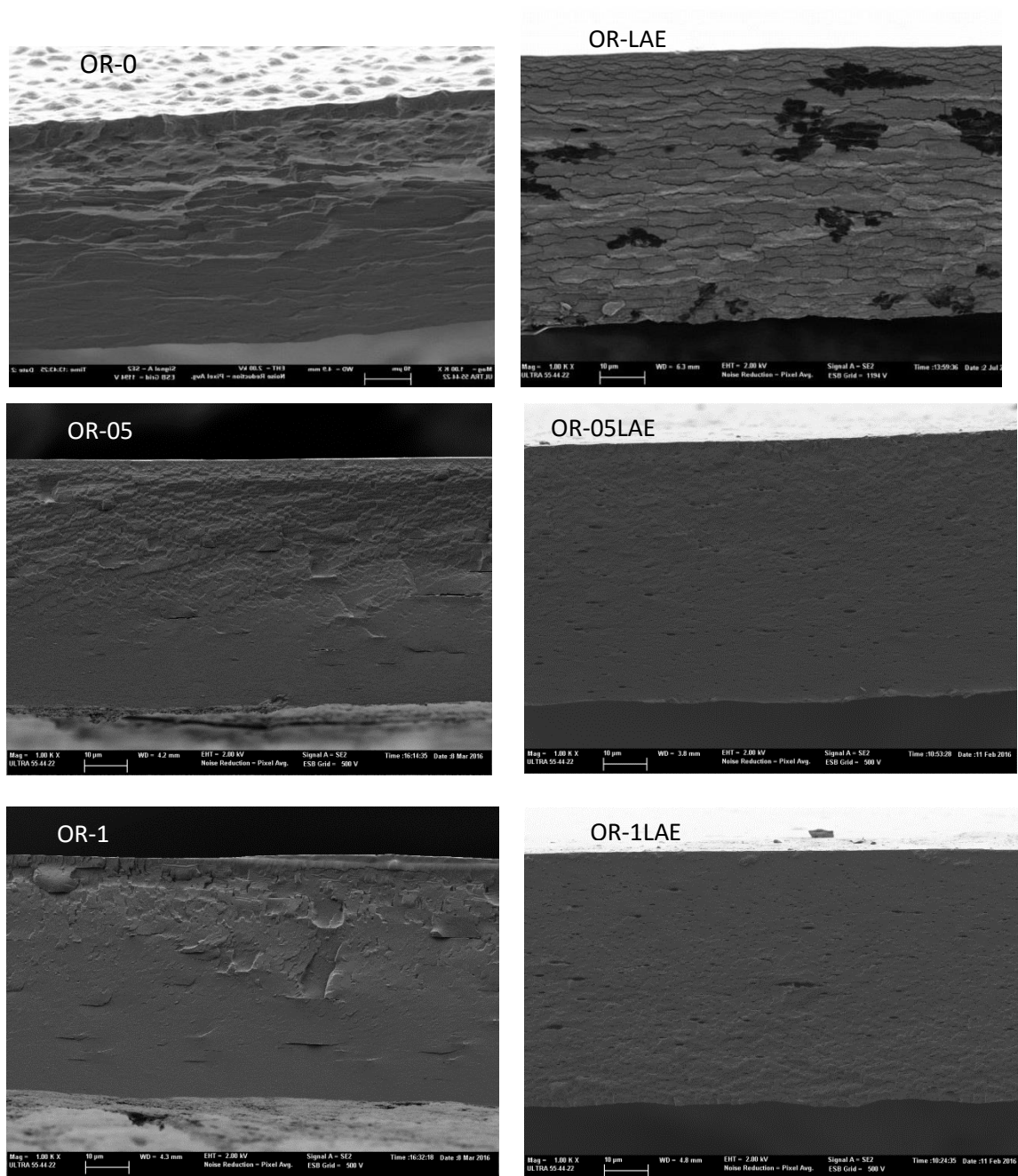


Figura 3.1. Microestructura de la sección transversal de los films mezcla almidón oxidado-gelatina obtenidas mediante FESEM.

3.2 Propiedades mecánicas de las películas

La figura 3.2 presenta las curvas tensión-deformación relativa de las diferentes películas obtenidas con almidón oxidado, sin y con LAE, en comparación con los obtenidos con el mismo almidón sin oxidar (ratio de oxidación 0) estudiados previamente (Moreno et al. 2016). Pueden observarse claramente los diferentes comportamientos mecánicos de las formulaciones en función del ratio de oxidación del almidón. La oxidación parcial (OR-0,5) comportó un descenso en la rigidez de las películas y un incremento en su extensibilidad respecto a la formulación con almidón no oxidado (OR-0), mientras que la oxidación completa (OR-1) incrementó en gran medida la rigidez de los films, haciéndolos menos extensibles. A su vez las curvas para OR-0 y OR-0,5 mostraron una meseta típica de la deformación plástica, la cual es apenas apreciable en los films OR-1, que mostraron una mayor fuerza de fractura, pero muy poca extensibilidad. Es remarcable el hecho de que la oxidación parcial no incrementó la rigidez, lo que es propio de los procesos de entrecruzado en la matriz, lo que podría deberse a la coexistencia de cadenas oxidadas y no oxidadas con un menor grado de empaquetamiento final en la matriz. La adición de LAE tuvo efectos diferentes, dependiendo del grado de oxidación del almidón; apenas afectó al comportamiento con almidón completamente oxidado, mientras que incrementó la extensibilidad de los films con almidón no oxidado y la disminuyó con la oxidación parcial. En los dos casos, provocó una disminución de los valores del esfuerzo, lo que supone menor rigidez y tensión de fractura de los films. Estos efectos revelan una interacción diferente del compuesto con los polímeros del film en función del nivel de oxidación del almidón.

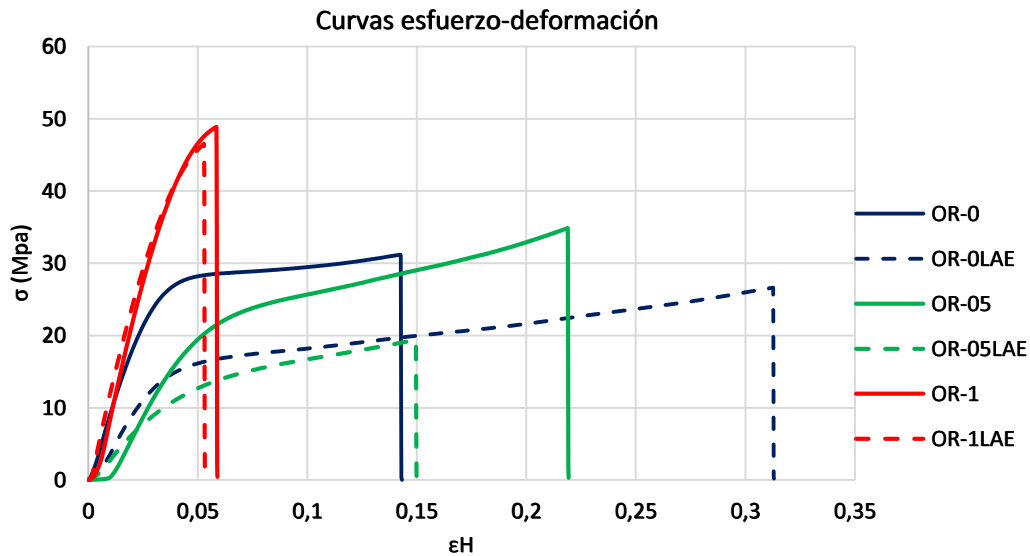


FIGURA 3.2 Curvas de esfuerzo σ (MPa)-deformación (ϵ_H) de los films con diferentes formulaciones.

En la tabla 3.1 se presentan los valores obtenidos para el espesor, módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TF) y porcentaje de extensibilidad (E%) para las diferentes películas. Tal como se ha observado en las curvas, los films obtenidos con ratio de oxidación 0,5 mostraron una menor rigidez y resistencia a la fractura, y una mayor extensibilidad que los films con almidón no oxidado, mostrando un comportamiento más plástico. Por otra parte, los films con ratio de oxidación 1 presentan los mayores valores de Modulo elástico y Tensión de fractura y el valor menor de extensibilidad. Los resultados parecen reflejar que el grado de entrecruzado de la matriz almidón gelatina, atribuible a las reacciones carbonilo-amino (reacciones de Maillard) no progresaron al mismo nivel en el caso de la oxidación parcial probablemente debido a la mayor heterogeneidad de las cadenas (con grupos hidroxilo y carbonilo) y a la mayor dificultad estérica para la formación de enlaces. Sin embargo, con la oxidación total del almidón, el efecto de entrecruzado se hace muy evidente en el comportamiento mecánico, que revela un gran fortalecimiento de la matriz. Estas muestras presentaron también una menor capacidad de adsorción de agua (Tabla 3.2), lo que es coherente con un carácter menos polar de la matriz inducido mediante la oxidación del almidón (Zhang et., al 2007), lo que puede también contribuir a su

menor plasticidad y extensibilidad. El agua tiene un efecto plastificante en las matrices de polímeros polares por su bajo peso molecular, y su interacción con las cadenas, debilitando las fuerzas de interacción entre ellas y aumentando su volumen libre y movilidad.

La adición de LAE supuso un descenso de la rigidez y extensibilidad de los films con ratio de oxidación 0,5, mientras que tuvo un efecto contrario en la extensibilidad con el almidón no oxidado. Por otro lado, los films con ratio de oxidación 1 no experimentaron cambios notables en su comportamiento mecánico con la adición de este compuesto. Tal como se ha comentado, la heterogeneidad de las cadenas parcialmente oxidadas en matriz comportará diferencias en cuanto a su grado de empaquetamiento, así como en la ubicación del compuesto activo, que también presenta grupos amino y podría también reaccionar con los carbonilos del almidón oxidado por el mismo mecanismo. Debido a su menor tamaño molecular, es esperable que sea más reactivo que las proteínas, con lo que el compuesto podría estar anclado a las cadenas oxidadas de almidón, limitando esto el entrecruzado de la matriz. No obstante, con una mayor proporción de grupos carbonilo en las cadenas de almidón (OR-1) no se observó efecto del LAE en el comportamiento mecánico.

TABLA 3.1 Valores de espesor (μm), parámetros mecánicos (EM (MPa), TF (MPa) y E%) de las formulaciones equilibradas al 53% de HR a 25 °C.

		OR-0 (*)	OR-05	OR-1
Espesor (μm)	Sin LAE	65±6 ^{b, y}	60±2 ^{a, x}	65±2 ^{b, x}
	Con LAE	61±3 ^{a, x}	64±2 ^{b, y}	65±9 ^{b, x}
ME (MPa)	Sin LAE	1020±190 ^{b, y}	470±70 ^{a, y}	1290±80 ^{c, x}
	Con LAE	510±90 ^{b, x}	360±70 ^{a, x}	1300±200 ^{c, x}
TF (MPa)	Sin LAE	33±6 ^{a, y}	21±6 ^{a, y}	46±8 ^{b, x}
	Con LAE	24±7 ^{a, x}	35±6 ^{a, x}	46±8 ^{b, x}
%E	Sin LAE	14±5 ^{b, x}	27±5 ^{c, y}	6,2±1,5 ^{a, x}
	Con LAE	35±2 ^{c, y}	18±10 ^{b, x}	7±2 ^{a, x}

Valores promedio y desviación estándar. Diferentes letras a, b, c en la misma fila indican diferencias significativas debidas al ratio de oxidación ($p < 0,05$). Letras diferentes x, y, z en la misma columna indican diferencias significativas debidas al LAE ($p < 0,05$). (*) Datos de un estudio previo: Moreno et al. (2016)

3.3 Humedad y propiedades barrera de las películas

La Tabla 3.2 muestra los valores de la humedad de las películas y sus permeabilidades al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP).

Tabla 3.2 Humedad de equilibrio (X_w , b.s%), permeabilidad al vapor de agua (WVP) y al oxígeno (OP) de las diferentes formulaciones

		OR-0 (*)	OR-05	OR-1
Xw (b.s%)	Sin LAE	12±3 ^{b, x}	8,1±0,5 ^{a, x}	8,9±0,5 ^{a, y}
	Con LAE	10,3±0,5 ^{b, x}	10,6±0,5 ^{b, y}	7,7±1,0 ^{a, x}
WVPx10⁷ (g·mm/kPa·h·m²)	Sin LAE	6,9±0,2 ^{c, y}	5,0±0,3 ^{b, x}	4,64±0,14 ^{a, x}
	Con LAE	5,0±0,6 ^{a, x}	5±0,9 ^{a, x}	5,2±0,6 ^{a, y}
OPx10¹³ (cm³/m s Pa)	Sin LAE	1,26±0,03 ^{b, x}	1,00±0,15 ^{ab, x}	0,75±0,09 ^{a, x}
	Con LAE	2,08±0,07 ^{b, y}	2,5±0,5 ^{b, x}	0,95±0,11 ^{a, x}

Valores promedio y desviación estándar. Diferentes letras a, b, c en la misma fila indican diferencias significativas debidas al ratio de oxidación ($p < 0,05$). Letras diferentes x, y, z en la misma columna indican diferencias significativas debidas al LAE ($p < 0,05$). (*) Datos de un estudio previo: Moreno et al. (2016)

Tanto los valores de humedad como los de WVP disminuyeron considerablemente al oxidar el almidón. Esto hecho es coherente a la formación de una matriz más hidrofóbica por la transformación $-OH$ a $-C=O$ en las cadenas de almidón, lo cual disminuye la capacidad de adsorción de agua (Zhang et al., 2007) y su difusión a través del material. La disminución del contenido en humedad de equilibrio fue diferente en presencia de LAE, que supuso valores de humedad similares con la oxidación total y valores en la oxidación parcial, indicando interacciones diferentes, en cada caso, del compuesto con los puntos activos para la adsorción de agua. Los valores OP disminuyeron también en las matrices oxidadas lo cual puede estar asociado a la menor humedad de la matriz y el consiguiente menor efecto plastificante del agua. La oxidación supuso, por tanto, la formación de matrices menos polares, con menor afinidad con el agua, y con propiedades barrera mejoradas, tanto al vapor de agua como al oxígeno.

Esto se debe, en parte, a su menor nivel de plastificación (menor humedad) y al entrecruzado de la matriz que ralentiza los fenómenos de transporte, al potenciar el factor de tortuosidad de la red polimérica.

La adición de LAE supuso un aumento de los valores de OP tanto en la formulación sin oxidación como en la de oxidación parcial. Esto puede atribuirse al carácter anfifílico del LAE que podría promover la solubilidad del oxígeno en la matriz. Sin embargo, no se observó efecto significativo del LAE en la OP de la matriz con oxidación total. La incorporación LAE no supuso grandes cambios en los valores de WVP de las matrices oxidadas, aunque hubo un pequeño incremento con la oxidación total. Estas diferencias pueden justificarse por la diferente microestructura de las formulaciones, que puede comportar diferentes velocidades de transporte de moléculas de oxígeno o de agua.

3.4 Propiedades ópticas

En la tabla 3.3 se presentan los valores obtenidos para las coordenadas de color de las películas: L_{ab}^* , luminosidad; C_{ab}^* , croma; h_{ab}^* , tono.

TABLA 3.3 Valores de los parámetros ópticos (luminosidad, croma y tono). Valores promedio y desviación estándar.

		OR-0(*)	OR-05	OR-1
L^*	Sin LAE	80,6±0,5 ^{cy}	76,8±1,1 ^{a,y}	78,0±0,8 ^{b,y}
	Con LAE	73,8±0,6 ^{a,x}	73,4±1,0 ^{a,x}	73,8±0,4 ^{b,x}
C_{ab}^*	Sin LAE	7,27±0,17 ^{c,y}	28±2 ^{b,x}	33,3±1,0 ^{a,y}
	Con LAE	4,41±0,08 ^{a,x}	28,3±0,7 ^{b,x}	29,2±0,7 ^{c,x}
h_{ab}^*	Sin LAE	98,0±0,3 ^{c,x}	81±2 ^{a,x}	91,2±0,7 ^{b,y}
	Con LAE	104,0±0,9 ^{b,y}	79,2±0,5 ^{a,x}	79,1±0,6 ^{a,x}

Valores promedio y desviación estándar. Diferentes letras a, b, c en la misma fila indican diferencias significativas debidas al ratio de oxidación ($p < 0,05$). Letras diferentes x, y, z en la misma columna indican diferencias significativas debidas al LAE ($p < 0,05$). (*) Datos de un estudio previo: Moreno et al. (2016)

La oxidación del almidón supuso un descenso en la luminosidad y el tono y un aumento del croma, en coherencia con la formación de compuestos pardos

resultantes de las reacciones de condensación carbonilo-amino. Así, las formulaciones con almidón oxidado presentaron tonos rojizos, indicadores de pardeamiento, a diferencia con las formulaciones sin oxidación. Adicionalmente, la adición de LAE supuso un descenso de la luminosidad en todas las formulaciones oxidadas y un descenso del tono, lo cual indica la participación del compuesto en las reacciones causantes de pardeamiento, lo cual no se evidenció en las muestras no oxidadas, donde provocó un aumento del tono y una disminución del croma. Con LAE, no hubo diferencias notables en los parámetros de color de las muestras oxidadas, lo que parece indicar que es la reacción de este compuesto con los carbonilos la causa mayor de pardeamiento.

En la Figura 3.3 se han representado los espectros de transmitancia interna (T_i) de las distintas formulaciones, en el intervalo de luz visible (400-700 nm).

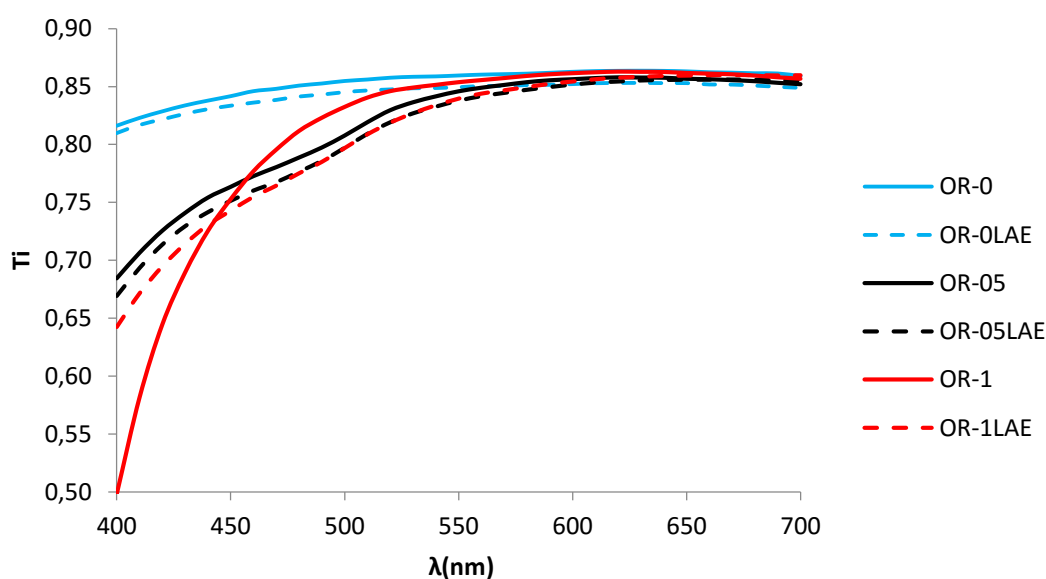


FIGURA 3.3 Espectros de transmitancia interna (T_i) entre 400 y 700 nm para las diferentes formulaciones

Se observa que, a mayor ratio de oxidación se obtuvieron unos valores de T_i más bajos a longitudes de onda menores, siendo más transparentes a altas longitudes de onda. Esto es coherente con la absorción selectiva de los

productos pardos de condensación formados (productos de Maillard) sobre todo a partir de compuestos de bajo peso molecular como azúcares reductores, provenientes de la hidrólisis parcial del almidón, las cuales se ven favorecidas por la mayor presencia de grupos carbonilo formados durante la oxidación. La adición de LAE no supuso cambios significativos en la transmitancia de las formulaciones, a excepción de la formulación con ratio de oxidación 1, donde la presencia de LAE aumentó la transmisión de luz para longitudes de onda entre 400-450 nm. La forma del espectro de la muestra con oxidación total sin LAE presentó valores muy bajos de transmitancia por debajo de 450 nm, revelando la formación de estructuras moleculares diferentes asociadas al alto nivel de entrecruzado de la matriz.

3.5 Migración total en simulantes alimentarios y solubilidad en agua

La Tabla 3.4 muestra los valores de migración de los diferentes films en tres simulantes alimentarios con diferente polaridad (etanol al 10 % agua: simulante de alimentos polares, ácido acético al 3 %: alimentos ácidos, e isooctano: alimentos grasos).

TABLA 3.4 Migración total (mg dm⁻²) de los diferentes films (durante 10 días a 20 °C) en diferentes simulantes alimentarios: etanol (10% v/v), ácido acético (3% w/v) e isooctano.

		OR-0(*)	OR-05	OR-1
Etanol 10% (v/v)	Sin LAE	108±15 ^{a, x}	243±30 ^{b, x}	218±40 ^{b, x}
	Con LAE	348±52 ^{b, y}	260±18 ^{ab, x}	237±3 ^{a, x}
Ácido acético 3% (w/v)	Sin LAE	362±36 ^{b, x}	236±21 ^{a, x}	247±20 ^{a, x}
	Con LAE	622±148 ^{b, x}	277±16 ^{a, x}	280±8 ^{a, x}
Isooctano	Sin LAE	47±24 ^{a, x}	51±65 ^{a, x}	25±32 ^{a, x}
	Con LAE	126±99 ^{a, x}	29±5 ^{a, x}	30,1±0,5 ^{a, x}

Valores promedio y desviación estándar. Diferentes letras a, b, c en la misma fila indican diferencias significativas debidas al ratio de oxidación (p <0,05). Letras diferentes x, y, z en la misma columna indican diferencias significativas debidas al LAE (p <0,05). (*) Datos de un estudio previo: Moreno et al. (2016)

Todos los valores de migración de todas las formulaciones y simulantes

excedieron los límites establecidos por la legislación vigente (10 mg dm^{-2}). No obstante, en las formulaciones con almidón oxidado la migración total en ácido acético 3% (w/v) descendió significativamente, pero no ocurrió así con los otros simulantes probados. Con etanol al 10% (v/v), aumentó de manera notable y con isooctano no hubo diferencias significativas respecto la formulación sin oxidación. Por otra parte, la adición de LAE no supuso variaciones significativas de migración total en las formulaciones con almidón oxidado, a pesar de que éste aumentó la migración en todos los casos con almidón no oxidado. Esto también apunta a la reacción y anclaje del LAE a los grupos carbonilos del almidón oxidado, limitando su migración al simulante.

En relación con la solubilidad en agua de los films, la Figura 3.4. muestra los valores obtenidos para la pérdida de peso de los films (por solubilización en agua) y su capacidad de hinchamiento (absorción de agua).

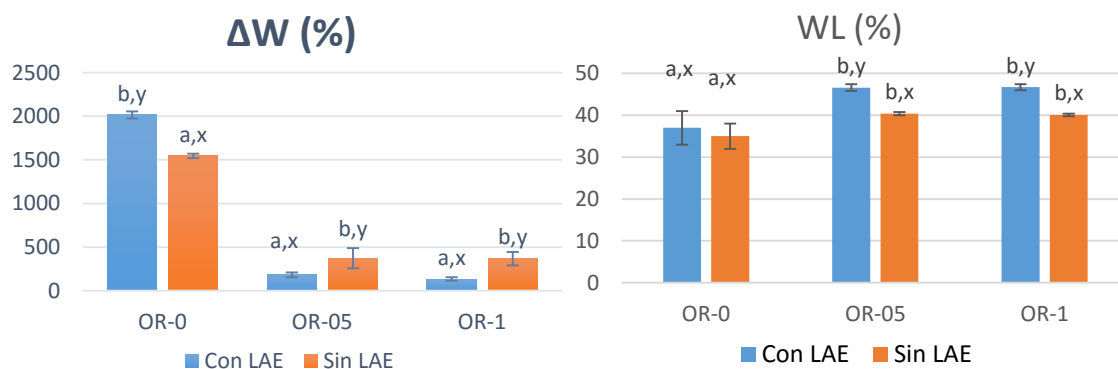


FIGURA 3.4 Pérdida de peso de los films (WL% g por 100g de film seco) y Capacidad de hinchamiento (ΔW %, g de agua por 100 g de film seco) después de 24 h de inmersión en agua destilada a 25°C . Valores promedio y desviación estándar. Diferentes letras a, b, c indican diferencias significativas entre los diferentes ratios ($p < 0,05$). Diferentes letras x, y, z indican diferencias significativas debidas a la adición de LAE ($p < 0,05$).

Puede observarse que la capacidad de hinchamiento disminuye en gran medida con la oxidación del almidón, en coherencia con la formación de una matriz polimérica menos polar, con menor capacidad para la formación de puentes hidrógeno. El entrecruzado también supone una limitación estérica para la retención de agua, ya que las cadenas tienen limitada su separación para la adsorción de agua por la formación de enlaces puente entre ellas. No obstante, la solubilización de compuestos del film en agua (pérdida de peso) fue mayor para las formulaciones oxidación del almidón. Esto podría atribuirse a la hidrólisis parcial de las cadenas durante el proceso oxidativo, lo que comportaría una mayor cantidad de moléculas de bajo peso molecular que se liberarían a la fase acuosa.

Por otro lado, la adición de LAE supuso un aumento de los valores de pérdida de peso en las formulaciones con almidón oxidado, pero un descenso de la capacidad de hinchamiento de los films. Este comportamiento contrasta con lo observado para la formulación sin oxidación, donde el LAE promovió la capacidad de hinchamiento de los films, a la vez que también aumentó ligeramente su solubilización. La mayor solubilización de los films con LAE podría explicarse por su reacción mayoritaria con los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular formados, liberándose estos al medio acuoso. Su efecto limitante de la capacidad de hinchamiento de los films parece indicar su participación activa en las reacciones de entrecruzado de los polímeros, colaborando en la limitación estérica para la separación de las cadenas durante la absorción de agua. Por consiguiente, el LAE parece reaccionar con grupos carbonilo de las cadenas y también de las moléculas de menor peso molecular resultantes de la hidrólisis parcial del almidón durante el proceso oxidativo. En este sentido apunta también el hecho de que, mientras la pérdida de peso es similar para los films oxidados, independientemente del grado de oxidación, la capacidad de hinchamiento se reduce, especialmente con LAE, en los films con oxidación total.

4. Conclusiones

La oxidación del almidón afectó a las propiedades mecánicas de los films, dependiendo del grado de oxidación. Con oxidación total, los films fueron más rígidos y menos extensibles, en coherencia con el mayor grado de entrecruzado de la matriz. Con oxidación parcial, por el contrario, los films fueron menos duros y extensibles, lo cual podría deberse a las heterogeneidades de las cadenas (con grupos $-OH$ y $C=O$) que limitan su empaquetamiento. En general la adición de LAE supuso un descenso de los valores de esfuerzo, excepto con la oxidación total, donde no se vio efecto significativo del compuesto sobre el comportamiento mecánico. Los films con almidón oxidado presentaron menores humedades de equilibrio y fueron en general menos permeables al vapor de agua y al oxígeno. La adición de LAE no afectó de manera notable a las propiedades barrera de los films oxidado, excepto un ligero aumento en la permeabilidad al oxígeno cuando la oxidación fue parcial. Los films con almidón oxidado presentaron coloraciones pardas relacionadas con la formación de productos Maillard debido reacción de los grupos carbonilo del almidón oxidado con grupos amino de las proteínas y, en su caso, del LAE. Con LAE, las muestras oxidadas presentaron un tono más rojizo y menor luminosidad indicando su participación en las reacciones de condensación con compuestos carbonílicos de menor peso molecular resultantes de la hidrólisis de almidón. No obstante, la muestra con oxidación total sin LAE presentó la menor transparencia a bajas longitudes de onda. Por otro lado, la migración total en ácido acético disminuyó considerablemente en formulaciones con almidón oxidado, al igual que su capacidad de hinchamiento en agua destilada, lo cual es coherente con el entrecruzado de la matriz y la menor capacidad para la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Por tanto, la oxidación previa del almidón para la obtención de films mixtos con gelatina, se plantea como una alternativa interesante en la mejora de las propiedades funcionales de los films como material de envase alimentario, pero la formación de coloraciones pardas podría limitar su uso en los casos donde se requiera un carácter incoloro del material.

5. Referencias

- Acosta, S., Jiménez, A., Cháfer, M., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2015). Physical properties and stability of starch-gelatin based films as affected by the addition of esters of fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 49, 135-143.
- Al-Hassan, A. A., & Norziah, M. H. (2012). Starch–gelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 108-117.
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapour transmission of materials. In Standard designations: E96-95 annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials..
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Standard D882 annual book of American Standard Testing Methods. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. ASTM.
- ASTM. (2005). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plasticfilm and sheeting using a coulometric sensor. In Standard designation: D3985-05:annual book of American Society for Testing Materials. West Conshohocken, PA: ASTM.
- Arvanitoyannis IS, Kassaveti A (2009) Starch-cellulose blends. In: Yu L (ed) Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources. Wiley, New York, pp 19–53
- Azeredo, H. M. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42(9), 1240-1253.
- Bakal, G., & Diaz, A. (2005). The lowdown on lauric arginate. *Food Qual*, 12(1), 54-61.
- Barnett, I., (2011). Packaging Solutions Throughout the Supply Chain: Technology, Trends and Future Outlook. *Business Insight*, London.
- BeMiller, J. N., & Whistler, R. L. (Eds.). (2009). *Starch: chemistry and technology*. Academic Press.
- Bertolini, A. (Ed.). (2009). *Starches: characterization, properties, and applications*. CRC Press.
- Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. C., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of food engineering*, 80(3), 972-978.
- Camargo Andrade-Molina, T. P., Shirai, M. A., Grossmann, M. V. E., & Yamashita, F. (2013). Active biodegradable packaging for fresh pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 25-29.
- Campos, R. P., Kwiatkowski, A., & Clemente, E. (2011). Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. *Revista Ceres*, 58(5), 554-560.
- Carvalho, A. J. F. (2008). Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. In M. N. Belgacem & A. Gandini (Eds.), *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (pp. 321–342). Amsterdam: Elsevier.

Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.

Davanço, T., Tanada-Palmu, P., & Grosso, C. (2007). Composite films made with gelatin, tracetin, stearic and caproic acids: effect of pH and surfactants addition on the functionality of films. *Food Science and Technology (Campinas)*, 27(2), 408-416.

Donovan, J. W. (1979). Phase transitions of the starch–water system. *Biopolymers*, 18(2), 263-275.

Du, Y. L., Cao, Y., Lu, F., Li, F., Cao, Y., Wang, X. L., & Wang, Y. Z. (2008). Biodegradation behaviors of thermoplastic starch (TPS) and thermoplastic dialdehyde starch (TPDAS) under controlled composting conditions. *Polymer Testing*, 27(8), 924-930.

Durrani, C. M., & Donald, A. M. (1995). Physical characterisation of amylopectin gels. *Polymer gels and networks*, 3(1), 1-27.

Fakhoury, F. M., Martelli, S. M., Bertan, L. C., Yamashita, F., Mei, L. H. I., & Queiroz, F. P. C. (2012). Edible films made from blends of manioc starch and gelatin–Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT-Food Science and Technology*, 49(1), 149-154.

Fishman, M. L., Coffin, D. R., Konstance, R. P., & Onwulata, C. I. (2000). Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 317–325.

Frost, K., Barthes, J., Kaminski, D., Lascaris, E., Niere, J., & Shanks, R. (2011). Thermoplastic starch-silica-polyvinyl alcohol composites by reactive extrusion. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 343–350.

García, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2000a). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65(6), 941–947.

Harper, C. A. (2004). *Handbook of Plastics, elastomers & Composites*. (4th ed.). Sydney, Mc Graw-Hill.

Higueras, L., López-Carballo, G., Hernández-Muñoz, P., Gavara, R., & Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International journal of food microbiology*, 165(3), 339-345.

Jenkins, P. J., Cameron, R. E., & Donald, A. M. (1993). A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch-Stärke*, 45(12), 417-420.

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058-2076.

Kaczmarek, H., Kowalonek, J., & Ołdak, D. (2003). The influence of UV-irradiation on poly (vinyl chloride) modified by iron and cobalt chlorides. *Polymer degradation and stability*, 79(2), 231-240.

- Kim, M., & Lee, S. J. (2002). Characteristics of crosslinked potato starch and starch-filled linear low-density polyethylene films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 331–337.
- Liu, H., Lelievre, J., & Ayoung-Chee, W. (1991). A study of starch gelatinization using differential scanning calorimetry, X-ray, and birefringence measurements. *Carbohydrate Research*, 210, 79-87.
- López, O. V., Zaritzky, N. E., Grossmann, M. V., & García, M. A. (2013). Acetylated and native corn starch blend films produced by blown extrusion. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 286-297.
- Luchese, C. Leites, Frick, J. M., Patzer, V. L., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2015). Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. *Food Hydrocolloids*, 45, 203-210.
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression—Molded gelatin-dialdehyde starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, 112(4), 2166-2178.
- Moreno, O., Díaz, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2016). Influence of the processing method and antimicrobial agents on properties of starch-gelatin biodegradable films. *Polymer International*.
- Moreno, O., Pastor, C., Muller, J., Atarés, L., González, C., & Chiralt, A. (2014). Physical and bioactive properties of corn starch–Buttermilk edible films. *Journal of Food Engineering*, 141, 27-36.
- Olsson, E., Johansson, C., Larsson, J., & Järnström, L. (2014). Montmorillonite for starch-based barrier dispersion coating—Part 2: Pilot trials and PE-lamination. *Applied Clay Science*, 97, 167-173.
- Osés, J., Niza, S., Ziani, K., & Mate, J. I. (2009). Potato starch edible films to control oxidative rancidity of polyunsaturated lipid: effects of film composition, thickness and water activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1360–1366.
- Paes, S. S., Yakimets, I., & Mitchell, J. R. (2008). Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, 22, 788–797.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., & Olsen, M. B. (2001). Physical and mechanical properties of biobased materials starch, polylactate and polyhydroxybutyrate. *Starch-Stärke*, 53(8), 356-361.
- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2007). A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydrate Polymers*, 67, 511–529.
- Reddy, N., & Yang, Y. (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118, 702–711.

- Rhim, J. W., Gennadios, A., Weller, C. L., Cezeirat, C., & Hanna, M. A. (1998). Soy protein isolate–dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8(3), 195-203.
- Ronda, F., & Roos, Y. H. (2008). Gelatinization and freeze-concentration effects on recrystallization in corn and potato starch gels. *Carbohydrate Research*, 343(5), 903–911.
- Ruckman, S. A., Rocabayera, X., Borzelleca, J. F., & Sandusky, C. B. (2004). Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- α -Lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food and chemical toxicology*, 42(2), 245-259.
- Saiah, R., Sreekumar, P. A., Leblanc, N., & Saiter, J. M. (2009). Structure and thermal stability of thermoplastic films based on wheat flour modified by monoglyceride. *Industrial crops and products*, 29(1), 241-247.
- Song, L., Farrah, S. R., & Baney, R. H. (2011). Bacterial inactivation kinetics of dialdehyde starch aqueous suspension. *Polymers*, 3(4), 1902-1910.
- Stopforth, J. D., Visser, D., Zumbrink, R., Van Dijk, L., & Bontenbal, E. W. (2010). Control of *Listeria monocytogenes* on cooked cured ham by formulation with a lactate-diacetate blend and surface treatment with lauric arginate. *Journal of Food Protection*®, 73(3), 552-555.
- Talja, R. A., Helén, H., Roos, Y. H., & Jouppila, K. (2007). Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 288–295.
- Tan, I., Wee, C. C., Sopade, P. A., & Halley, P. J. (2004). Investigation of the starch gelatinisation phenomena in water-glycerol systems: application of modulated temperature differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 58, 191–204.
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Vega, J., & Wong, M. (2015). Influence of Botanic Origin on the Morphology and Size of Starch Nanoparticles From Andean Native Starch Sources. *Polymers from Renewable Resources*, 6(3), 91.
- Wang, X., Gu, Z., Qin, H., Li, L., Yang, X., & Yu, X. (2015). Crosslinking effect of dialdehyde starch (DAS) on decellularized porcine aortas for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 79, 813-821.
- Whistler, R. L., & Daniel, J. R. (1984). Molecular structure of starch. *Starch: Chemistry and technology*, 2, 153-182.
- Wilhelm, H.-M., Sierakowski, M.-R., Souza, G.P., Wypych, F. (2003) Starch films reinforced with mineral clay. *Carbohydrate Polymers*, 52, 101–11
- Yam, K. L. (Ed.). (2010). *The Wiley encyclopedia of packaging technology*. John Wiley & Sons.
- Zhang, S. D., Zhang, Y. R., Zhu, J., Wang, X. L., Yang, K. K., & Wang, Y. Z. (2007). Modified corn starches with improved comprehensive properties for preparing thermoplastics. *Starch-Stärke*, 59(6), 258-268.

