

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA I DEL MEDIO
NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Hidrogeles de almidón-PVA como vehículos de antimicrobianos para el envasado activo de alimentos.

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA
DE LOS ALIMENTOS**

Realizado por:

Sergio Campos Rosillo

Tutora:

Amparo Chiralt Boix

Director experimental:

Alberto Jiménez Marco

VALENCIA, JULIO DE 2015

HIDROGELES DE ALMIDÓN-PVA COMO VEHÍCULOS DE ANTIMICROBIANOS PARA EL ENVASADO ACTIVO DE ALIMENTOS.

Sergio Campos Rosillo, Alberto Jiménez Marco, Amparo Chiralt Boix¹

Resumen

En el presente trabajo se obtuvieron hidrogeles de almidón-PVA (poli vinil alcohol) mediante ciclos de congelación-descongelación con y sin tratamiento con ácidos policarboxílicos (ácido cítrico y ácido maleico), analizando su microestructura y su capacidad para incorporar agentes antimicrobianos (aceite esencial de canela: CEO) en forma de emulsión acuosa con gelatina como estabilizante. Los hidrogeles impregnados se incorporaron al envase de manzana fresca cortada (var. *Granny Smith*) para estudiar el efecto antimicrobiano del compuesto activo liberado en el espacio de cabeza del envase, a temperatura de refrigeración (10°C). Se analizó la densidad, pH, tamaño de partícula y potencial ζ de las dispersiones acuosas del aceite con gelatina, así como la microestructura, el grado de entrecruzamiento y la capacidad de impregnación de los hidrogeles con las dispersiones. Para el análisis microbiológico se inocularon las muestras de manzana con una cantidad conocida de *Listeria innocua* y se hicieron recuentos a 2, 5 y 8 días de almacenamiento. El análisis microbiológico reveló diferencias en la liberación del activo del hidrogel en función del tamaño de poro y entrecruzado de cadenas. Los hidrogeles sin tratamiento ácido de mayor tamaño de poro liberaron más rápido el compuesto activo que ejerció su acción en los primeros controles. Sin embargo, los hidrogeles tratados con ácido maleico, con mayor entrecruzado de cadenas liberaron el activo a los 8 días, cuando se vio su actividad antimicrobiana.

Palabras clave: hidrogeles de almidón-PVA, envasado activo, antimicrobianos, aceite esencial de canela, liberación controlada.

Resum

En l'actual treball es varen obtenir hidrogeles de midó-PVA (poli vinil alcohol) mitjançant cicles de congelació-descongelació amb i sense tractament amb àcids policarboxílics (àcid cítric i àcid malèic), analitzant la seva microestructura i la seva capacitat per a incorporar agents antimicrobians (oli essencial de canela: CEO) en forma d'emulsió aquosa amb gelatina com a estabilitzant. Els hidrogeles impregnats s'incorporaren a l'envasat de poma fresca tallada (var. *Granny Smith*) per a l'estudi de l'efecte antimicrobià del compost actiu lliberat a l'espai de capçalera, a temperatura de refrigeració (10°C). Es va analitzar la densitat, pH, tamany de partícula i potencial ζ de les dispersions aquoses de l'oli amb gelatina, així com la microestructura, el grau d'entrecruament i la capacitat d'impregnació dels hidrogeles amb les dispersions. Per a l'anàlisi microbiològic s'inocularen les

¹Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

mostres de poma amb una quantitat coneguda de *Listeria innocua* i es feren recomptes a 2, 5 i 8 dies d'emmagatzematge. L'anàlisi microbiològic va revelar diferències en la lliberació de l'actiu de l'hidrogel en funció del tamany de porus i entrecreuament de cadenes. Els hidrogels sense tractament àcid, de major tamany de porus lliberaren més ràpid el compost actiu, que va exercir la seva acció en els primers controls. No obstant, els hidrogels tractats amb àcid malèic, amb major entrecreuament de cadenes lliberaren l'actiu als 8 dies, quan es va apreciar la seua activitat antimicrobiana.

Paraules clau: hidrogels de midó-PVA, envasat actiu, antimicrobians, oli essencial de canela, lliberació controlada.

Abstract

In the present work, hydrogels of starch-PVA (poly vinyl alcohol) were obtained by freezing-thawing cycles, with and without incorporation of polycarboxylic acids (citric acid and maleic acid). Their microstructure and capacity to absorb antimicrobial agents (cinnamon essential oil: CEO) as aqueous emulsion with emulsifying gelatin was analyzed. Impregnated hydrogels were incorporated into the packaging of fresh-cut apple (var. *Granny Smith*) to study of the antimicrobial effect of the active compound released in the packaging head space throughout cold storage (10°C). Density, pH, particle size and ζ -potential of the gelatin-CEO aqueous dispersions were determined, as well as the microstructure, the crosslinking degree and the impregnation capacity of the hydrogels. For the microbial analysis fresh cut apple samples were inoculated with *Listeria innocua* and stored in closed bottles containing impregnated hydrogels with active compounds. Microbial counts were carried out at 2, 5 and 8 storage days. The microbial analysis revealed differences in the active compound release from the hydrogels according to their pore size and the chains crosslinking. The hydrogels without acid incorporation, with bigger pore size, released more quickly the active compound, showing notable antimicrobial action at the first control time. However, the hydrogels with maleic acid incorporation, with greater crosslinking degree, released the active compound after 8 storage days, where their effective antimicrobial activity was observed.

Key words: hydrogels of starch-PVA, active packaging, antimicrobials, cinnamon essential oil, controlled release.

1. Introducción.

En los últimos años, debido a los nuevos hábitos de vida, ha aumentado la tendencia hacia el consumo de alimentos de cuarta y quinta gama. Del mismo modo, existe una preocupación creciente de los consumidores por su salud y por el efecto de la dieta como factor de riesgo

de enfermedades como la obesidad, las enfermedades coronarias, la hipercolesterolemia, etc.

Debido a estos factores, la producción y el consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas cada vez va teniendo más acogida en el mercado, ya que se trata de productos naturales con numerosos beneficios para la salud y que además permiten un ahorro de tiempo asociado al lavado, pelado y cortado de estos alimentos. No obstante, la producción de frutas y hortalizas mínimamente procesadas requiere un elevado control sanitario desde el momento de la cosecha, siendo el almacenamiento el periodo más crítico, ya que es un tipo de producto susceptible de sufrir ataques de microorganismos y reacciones de deterioro producto de la respiración y maduración del producto (pardeamiento enzimático, senescencia, etc.).

En este contexto, y con el fin de aumentar la vida útil de este tipo de productos y disminuir las pérdidas causadas por crecimiento de microorganismos, se utilizan diferentes técnicas de envasado, entre las que se encuentran el envasado con atmósfera modificada (MAP), el recubrimiento de la fruta con films comestibles (Perdones et al., 2014) o el envasado activo (Almenar et al., 2009).

Los productos vegetales mínimamente procesados son aquellos que han sufrido una serie de tratamientos suaves y que mantienen una calidad de producto fresco, uniforme y consistente, en comparación con el producto inicial (IFPA, 2002).

Los frutos frescos cortados (FFC), son productos preparados a partir de operaciones básicas como lavado, pelado, deshuesado y cortado, y que pueden incluir operaciones de higienizado con derivados clorados, peróxido de hidrógeno, ozono, antimicrobianos naturales y otros, tratamientos con estabilizadores de color, como el ácido ascórbico, o retenedores de firmeza, como las sales de calcio (Soliva-Fortuny & Martín-Belloso, 2003). Estos productos deben almacenarse a temperaturas de refrigeración (2-5 °C) para ralentizar el deterioro del producto, así como para evitar el crecimiento de microorganismos, y a ser posible y como se ha mencionado, con envasado con atmósfera protectora, modificada o envasado activo. De esta manera, los FFC pueden ser consumidos durante un periodo entre 7 y 14 días según el producto y técnica de conservación aplicada (Ahvenainen, 2000).

El envasado activo es una tecnología de envasado relativamente reciente cuyo propósito es mantener o alargar la vida útil y calidad del producto mediante dos técnicas; la liberación de sustancias activas o la eliminación de componentes indeseables. Aunque no existe un gran número de aplicaciones en el mercado, existe legislación a nivel europeo que regula todo lo relacionado con los envases activos (Comisión Europea, 2009) y diferentes proyectos europeos participados por empresas están encaminados a la obtención de aplicaciones reales tanto en fruta fresca cortada como en cosméticos (Easyfruit, 2015; Acticospack, 2014). En relación a lo anterior, los envases activos pueden, por un lado retener sustancias indeseables del producto o el entorno (O₂, H₂O, CO₂, etileno, etc.) y por el otro liberar sustancias beneficiosas al producto o el entorno tales como antioxidantes, antimicrobianos, etc.

La liberación de las sustancias activas, o la retención, puede realizarse desde el propio material de envase, independientemente de su origen, o desde distintos dispositivos o *releasing devices* que se incluirían dentro del envase primario donde se sitúa el producto. En este contexto, los llamados hidrogeles presentan una gran aplicabilidad debido a sus adecuadas propiedades físicas.

Por definición, los hidrogeles son una red de polímeros capaces de absorber elevadas cantidades de agua y otras soluciones o mezclas. En dicha red existen grupos hidrofílicos que se hidratan en un entorno acuoso, dando lugar a la estructura propia de hidrogel (Peppas, 1986).

Para que la formación del hidrogel tenga lugar, tiene que darse un fenómeno llamado *crosslinking* que permite evitar la disolución de las cadenas poliméricas en la fase acuosa tras la formación del hidrogel. El *crosslinking* consiste en crear enlaces entre las distintas cadenas de la red polimérica, bien químicos (covalentes), o bien físicos (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) (Lowman & Peppas, 1999). Esto se puede conseguir utilizando diferentes métodos, como variar la temperatura y el tiempo de agitación de las mezclas o mediante ciclos de congelación-descongelación (Gao et al., 2008), para conseguir *crosslinking* físico, o añadiendo determinados aditivos a las mezclas, como ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido maleico, etc.) para producir *crosslinking* químico (Hennink & van Nostrum, 2002) a través de la formación de enlaces tipo éster.

Debido a su matriz porosa y a su elevada capacidad de absorción de agua o disoluciones acuosas, los hidrogeles son de elevado interés como dispositivos de liberación controlada de sustancias bioactivas, pudiendo incluso responder a estímulos externos, como cambios en la temperatura (Çiçek & Tuncel, 1998) o en el pH (Bettini et al., 1995).

Existen diversos tipos de polímeros capaces de formar hidrogeles, obtenidos por síntesis química o de fuentes naturales y, dependiendo de su naturaleza, éstos pueden ser biocompatibles y/o biodegradables. Algunos de los polímeros biodegradables y biocompatibles que pueden utilizarse para formar hidrogeles son el almidón y el poli(vinil alcohol) (PVA) (Peppas et al., 2000).

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes, solo por detrás de la celulosa, y, como materia prima, es renovable, barata y ampliamente disponible (Lourdin et al., 1995). Este polímero está formado, en estado nativo por dos componentes macromoleculares: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal formado por unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4. Por el contrario, la amilopectina es una molécula muy ramificada formada por cadenas cortas de glucosas unidas por enlaces α -1,4 con ramificaciones en α -1,6 que se suceden cada 25-30 unidades de glucosa (1) (Liu, 2005). El almidón es un biopolímero interesante para la formación de hidrogeles debido a su abundancia en la naturaleza, biodegradabilidad, biocompatibilidad y su bajo coste en relación a otros polímeros.

En relación al PVA (Figura 1) es destacable que, aunque se obtiene tras un proceso de síntesis, es totalmente biodegradable y su compatibilidad

con el almidón para formar hidrogeles ha sido probada con anterioridad (Xiao & Yang, 2006).

Como se ha comentado, se pueden utilizar aditivos para mejorar el *crosslinking* mediante la formación de enlaces químicos covalentes de tipo éster. En este sentido, es común la utilización de ácidos orgánicos policarboxílicos (Figura 1), como el ácido cítrico o el ácido maleico (Narendra & Yiqi, 2010; Pang et al., 2011).

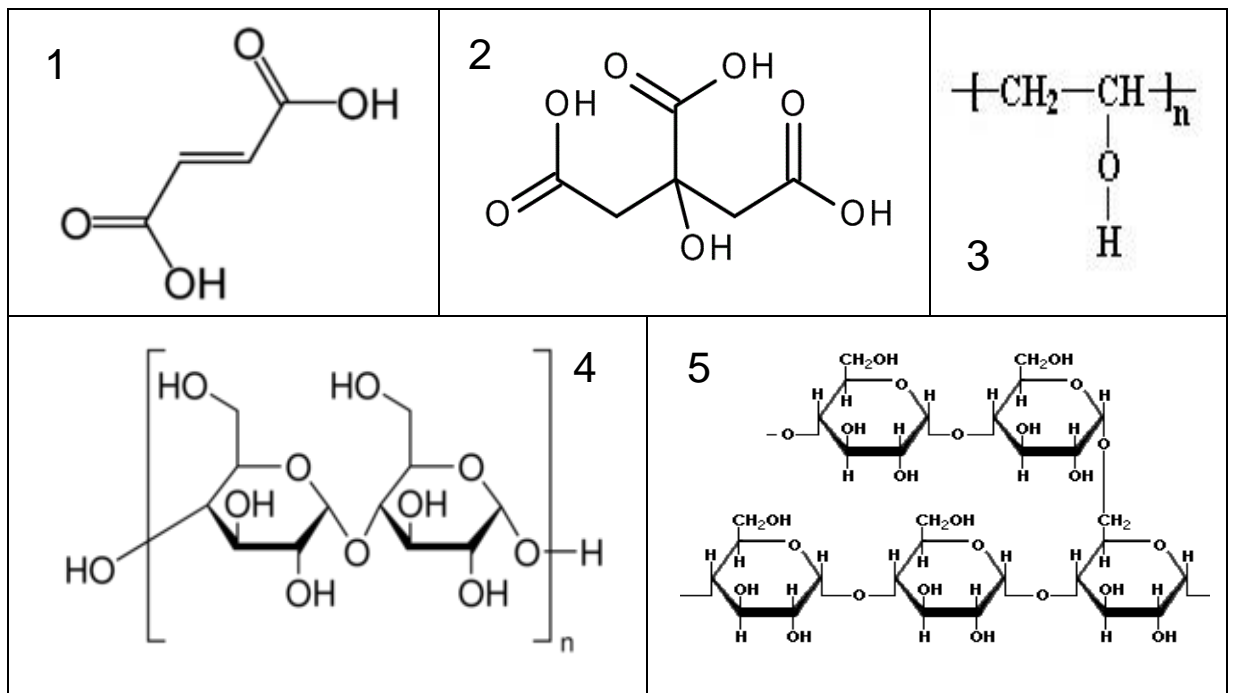


FIGURA 1. Fórmula química del ácido cítrico (1), ácido maleico (2), poli(vinil alcohol) (3), amilosa (4) y amilopectina (5).

Los hidrogeles formados a partir de almidón y PVA, con o sin adición de ácidos policarboxílicos, han demostrado una gran capacidad de retención de agua (Gao & Xiao, 2005). Esta propiedad puede aprovecharse para incorporar en el hidrogel sustancias capaces de actuar como antimicrobianos, limitando así el crecimiento de bacterias y hongos responsables del deterioro de los alimentos.

Unas de las sustancias más comúnmente utilizadas como antimicrobianos en nuevas aplicaciones de envasado son los aceites esenciales. Estas sustancias, extraídas de distintas especies vegetales contienen generalmente una gran cantidad de compuestos fenólicos y terpenos que les confieren una elevada capacidad antimicrobiana y antioxidante. Entre éstos aceites, uno de los más efectivos es el aceite de canela, que es la fracción líquida volátil que se obtiene de la corteza desecada de la planta *Cinnamomum zeylanicum*. Esta mezcla hidrofóbica contiene como principales componentes cinamaldehído y eugenol (Burt, 2004).

Debido a la naturaleza predominantemente volátil e hidrofóbica de los antimicrobianos más comúnmente usados en envasado activo (Fleming-Jones & Smith, 2003; Liang, et al., 2012), se hace necesaria su incorporación en los hidrogeles en forma de una emulsión.

Una de las sustancias que puede emplearse para obtener emulsiones estables, debido a su carácter anfifílico, es la gelatina. Esta proteína se obtiene a partir del colágeno, el componente principal del tejido fino conectivo animal, mediante un proceso ácido-básico que causa la hidrólisis de éste (Giménez et al., 2004) y tiene la capacidad de gelificar a determinadas temperaturas cuando se encuentra en solución acuosa (Choi y Regenstein, 2000). Esta propiedad permite estabilizar perfectamente la emulsión en las condiciones de almacenamiento de la fruta fresca cortada, debido al estado sólido del gel formado.

En base a esto, el objetivo del presente trabajo es la utilización de hidrogeles de almidón-PVA como vehículos de dispersiones de gelatina con aceite esencial de canela a fin de obtener dispositivos de liberación controlada de los compuestos activos para su utilización en el envasado activo, evaluando su poder antimicrobiano en manzana fresca cortada envasada y almacenada en condiciones de refrigeración.

2. Materiales y métodos.

2.1. Materiales.

El almidón de maíz se obtuvo de Roquette Laisa España, S. A. (Benifaió, España). El poli(vinil alcohol) (PVA), ácido cítrico y ácido maleico fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La gelatina, utilizada en la impregnación, fue suministrada por Sancho de Borja S. L. (Zaragoza, España). Por último, el aceite esencial de canela corteza fue suministrado por Herbes del Molí (Benimarfull, Alicante).

2.2. Preparación y caracterización de microemulsiones.

Se prepararon 2 formulaciones diferentes: gelatina con aceite esencial de corteza de canela (CEO) y gelatina control. Para ambos se disolvió 2 % (p/p) de gelatina en agua destilada. Para la gelatina-CEO, instantes antes de emulsionar mediante un equipo de ultrasonidos (Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific, Illkirch, France), se incorporó 2 % (p/p) de CEO respecto a la disolución de gelatina en agua. A continuación, la mezcla se sonicó a 20 kHz durante 600 s (frecuencia de 1 s^{-1}). Las dispersiones obtenidas se filtraron con papel de filtro Whatman tipo 1 para eliminar las partículas de mayor tamaño.

2.2.1. Ph.

El pH de las mezclas de gelatina y gelatina-CEO se midió usando el pHmetro (Crison GLP +21, Crison Instruments S. A., Hospital del Llobregat,

Barcelona, España). Para ello, se situaron las muestras en el equipo con agitación y a una temperatura de 25 °C. Se consideraron 3 repeticiones para cada formulación.

2.2.2. Densidad.

La densidad de las mezclas de gelatina y gelatina-CEO se midió usando el método del picnómetro. Para ello, se pesó el picnómetro vacío, el picnómetro con agua destilada y el picnómetro con las mezclas. Para determinar la densidad (ecuación 1), se considero la densidad del agua destilada, a 25 °C, de 1 g/mL.

$$\rho_d = \frac{m_{p+d} - m_p}{m_{p+w} - m_p} \times \rho_w \quad (1)$$

Dónde, ρ es la densidad de la muestra, ρ_w la densidad del agua, m_{p+d} respresenta la masa del picnómetro con la muestra, m_p la masa del picnómetro y m_{p+w} la masa del picnómetro con agua. Se consideraron 3 repeticiones para cada formulación.

2.2.3. Tamaño de partícula.

El tamaño de partícula en las dispersiones de gelatina-CEO se determinó usando un analizador del tamaño de partículas Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) considerando el método de Zhang et al. (2012). Las muestras se diluyeron en agua destilada (1:100) y fueron medidas a 25 °C. Se consideraron 6 repeticiones.

2.2.4. Potencial ζ .

El potencial ζ se determinó usando el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), considerando el método descrito por Jiménez et al. (2014). Las muestras fueron diluidas en agua destilada (1:100) y medidas a 25 °C. Se consideraron 6 repeticiones de cada formulación.

2.3. Preparación y caracterización de hidrogeles.

Los hidrogeles de almidón-PVA se prepararon de la siguiente manera: dispersiones con un 4 % (p/p) de almidón se mantuvieron a 95 °C durante 30 minutos con el objetivo de romper los granulos de almidón y facilitar la gelatinización. Por otro lado, suspensiones con un 4 % (p/p) de PVA se calentaron a 90 °C durante 20 minutos en agitación para promover la disolución del polímero. Ambas disoluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se mezclaron (ratio 1:1) y se agitaron durante 30 min con el fin de homogeneizar completamente la mezcla. La mezcla con, únicamente, almidón y PVA se consideró como muestra control. Además, con el fin de aumentar el *crosslinking* entre las cadenas de almidón y PVA, se añadió

ácido cítrico o ácido maleico. Las mezclas, conteniendo o no un 5 % de ácido cítrico o maleico (g ácido/g polímero), fueron agitadas durante 30 minutos a 95 °C para promover el *crosslinking*. La formación del hidrogel se llevó a cabo mediante ciclos de congelación-descongelación. 20 g de suspensión se vertieron en placas petri esterilizadas de 9 cm de diámetro y fueron congeladas a -20 °C. Se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación durante 3 días consecutivos, como indican Peppas & Stauffer (1991). Finalmente, las muestras se liofilizaron y se almacenaron a temperatura ambiente y 0 %HR previamente a su impregnación o análisis.

2.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

El análisis microestructural de los hidrogel se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido. Los hidrogel se mantuvieron en un desecador con P₂O₅ previo a la observación, para evitar su hidratación. Para el análisis, muestras de pequeño tamaño de cada formulación se congelaron en nitrógeno líquido y se criofracturaron, con el fin de analizar su estructura interna. Las muestras se fijaron en soportes de cobre, recubiertas con oro y se observaron usando una tensión de aceleración de 10 kV.

2.3.2. Impregnación a vacío.

Los hidrogel se hidrataron con las dispersiones, ya sonicadas, de gelatina y gelatina-CEO por impregnación a vacío. Éste método consiste en sumergir los hidrogel en dichas mezclas y mantenerlos a 7 mbar durante 30 min (Vacuubrand MZ 2C NT diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany). Seguidamente, se restableció la presión atmosférica y se mantuvieron sumergidas durante 24 h para la absorción de los líquidos.

2.3.3. Capacidad de hinchamiento (swelling).

La capacidad de hinchamiento de los hidrogel se midió pesando los hidrogel antes y después de la impregnación a vacío, tal y como indican Hsieh & Liao (2013). Después de 24 horas de inmersión, se eliminó el exceso de agua superficial y se pesaron los hidrogel hidratados. La capacidad de hinchamiento se obtuvo mediante la ecuación 2:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{G_s - G_i}{G_i} \times 100 \quad (2)$$

Donde, G_i represente el peso inicial del hidrogel liofilizado y G_s es el peso del hidrogel impregnado.

2.3.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics

Corp., Rockville, MD). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95 %.

2.3.5. Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).

La espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier se utilizó para evidenciar la formación de nuevos enlaces en las muestras estudiadas utilizando el modo reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) como describen Jiménez et al. (2014). Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C utilizando un espectrómetro Tensor 27 mid-FTIR Bruker (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipado con una celda óptica Platinum ATR y un detector RT-Dia TGS (Bruker, Karlsruhe, Germany). Las condiciones de medida fueron las siguientes: el diafragma se estableció en 4 mm mientras que la velocidad de escaneo fue de 10 kHz. Para la medida de la referencia (aire) y las muestras se consideraron 154 escaneos entre 4000 y 800 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . Tras las medidas, los datos obtenidos fueron tratados con el software OPUS (Bruker, Karlsruhe, Germany). Los espectros iniciales de absorbancia fueron suavizados utilizando el algoritmo de Savitsky-Golay (13 puntos) y se realizó un centrado y normalización de los datos así como una corrección de línea base.

2.3.6. Actividad antimicrobiana.

El análisis de la capacidad antimicrobiana de los hidrogeles impregnados se determinó in vivo utilizando manzana fresca cortada variedad *Granny Smith*. Para ello, la bacteria *L. innocua* (CECT 910) fue regenerada a partir de un cultivo almacenado en congelación tomando una cantidad determinada mediante un asa de siembra y redispersándola en un tubo con 10 ml de caldo soja-triptona (TSB) (Scharlab, Barcelona) que se incubó a 37 °C durante 24 h. A continuación, 10 μl de este cultivo se traspasaron a un nuevo tubo que se mantuvo a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. A partir de este cultivo (cultivo trabajo) se preparó una solución de TSB conteniendo 10^6 UFC/ml que se utilizó para inocular trozos de manzana cortada. Las manzanas, obtenidas de un mercado local, se lavaron, pelaron y cortaron en trozos de tamaño similar de 5 g. Estos trozos se sumergieron durante 30 s en la solución de bacterias e inmediatamente se colocaron en botes twist-off herméticamente cerrados. En dichos botes se colocaron, sin contacto directo, hidrogeles impregnados con las distintas formulaciones y se almacenaron durante 8 días a 10 °C.

Los recuentos microbianos se realizaron tras 2, 5 y 8 días de almacenamiento utilizando agar Palcam. Para ello, las muestras de manzana se sacaron en condiciones asépticas de los botes y se colocaron en bolsas estériles conteniendo 45 mL de agua de peptona tamponada. Estas bolsas fueron entonces homogeneizadas en un mezclador Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience) durante 2 minutos. A partir de aquí se prepararon y sembraron en placa distintas diluciones que fueron incubadas durante 48 h a 37 °C previamente al recuento. Todo los recuentos se realizaron por

duplicado para cada una de las muestras con los diferentes hidrogeles en el envase.

3. Resultados.

3.1. Características de la emulsión de aceite esencial.

La caracterización del pH, la densidad, el tamaño de partícula, su distribución, y el potencial ζ de las emulsiones es de interés por su relación con la estabilidad (Kosegarten-Conde & Jiménez-Munguía, 2012). En la Tabla 1 se observa que no hay diferencias significativas en cuanto a la densidad y el potencial ζ entre la dispersión de gelatina con aceite esencial de canela (Ge+CEO) y la gelatina control (Ge). Sí que se observa una ligera disminución en el pH en la formulación con aceite, lo que es debido al carácter ácido de algunos componentes del aceite esencial como los fenoles. Esta disminución de pH estuvo asociada un ligero aumento del valor del potencial ζ , lo que indica que el mayor alejamiento del punto isoeléctrico de la gelatina (PI: 6-9,5) provoca un mayor grado de ionización del polímero con el consiguiente incremento de la carga de la cadena y del potencial ζ medido. Por otro lado, los valores similares de este parámetro obtenidos para las dispersiones con y sin CEO permiten deducir que la proteína se encuentra adsorbida en la superficie de las micro-gotas, contribuyendo esto a la estabilización de la emulsión por carga y por estabilización estérica.

TABLA 1. Promedio y desviación estándar de los valores de pH, densidad, y potencial Z de las dispersiones de gelatina y gelatina-CEO. Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$).

Dispersión	pH	Densidad (g/mL)	Potencial ζ (mV)
Ge	4,60 \pm 0,02 ^a	1,00610 \pm 0,00013 ^a	+12,2 \pm 0,8 ^a
Ge+CEO	4,52 \pm 0,01 ^b	1,00617 \pm 0,00015 ^a	+12,8 \pm 1,2 ^a

En la Figura 2 se muestra la distribución de los tamaños de partícula de la emulsión de gelatina con CEO, donde puede observarse el tamaño nanométrico de las gotas. El promedio zeta del tamaño fue de 430 \pm 70 nm, lo cual indica que el método de emulsionado fue efectivo, dando lugar a micro-gotas que favorecen la estabilidad de la emulsión. El pequeño tamaño de las gotas de aceite, así como su carga y la adsorción superficial de gelatina, permitió obtener emulsiones muy estables que no presentaron separación de fases en todo el periodo de experimentación.

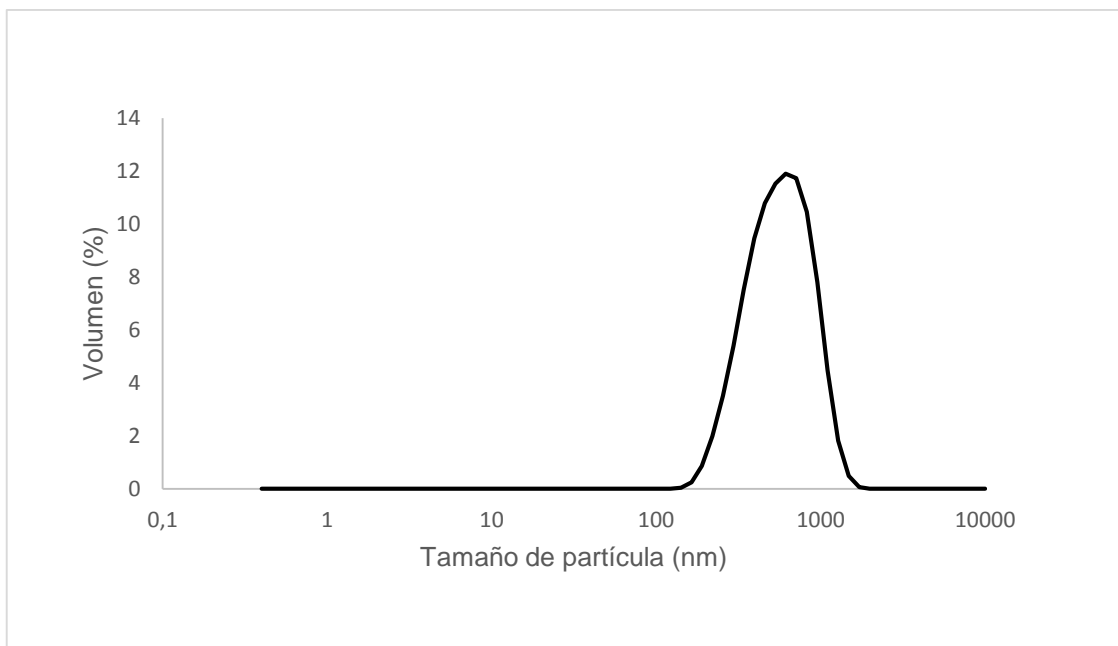


FIGURA 2. Distribución de los tamaños de partícula de la emulsión de gelatina con aceite esencial de canela (Ge+CEO).

3.2. Características de los hidrogeles.

Los hidrogeles obtenidos fueron caracterizados en su microestructura, nivel de entrecruzado de las cadenas y grado de hinchamiento con las emulsiones de gelatina y aceite esencial.

3.2.1 Micro y nanoestructura estructura.

La Figura 3 muestra las micrografías de los tres hidrogeles donde puede observarse su gran porosidad y de forma cualitativa el tamaño de sus poros. La matriz obtenida con ácido maléico fue más compacta y con poros de menor tamaño que las obtenidas con solo almidón-PVA o con ácido cítrico como agente entrecruzante. A su vez, el ácido cítrico potenció el nivel de compacidad de la matriz (poros menos abiertos), aunque no se aprecian diferencias notables en el tamaño. El análisis microestructural reflejó un mayor entrecruzado de los polímeros cuando se realizó el tratamiento con ácidos poli-carboxílicos y especialmente con el ácido maleico. Además de las previsible reacciones de esterificación de los carboxilos de los ácidos con los $-OH$ de los polímeros, el doble enlace de la molécula de maleico (Figura 1) podría experimentar también reacciones de adición con los $-OH$ de los polímeros, contribuyendo así en mayor medida al proceso de entrecruzado.

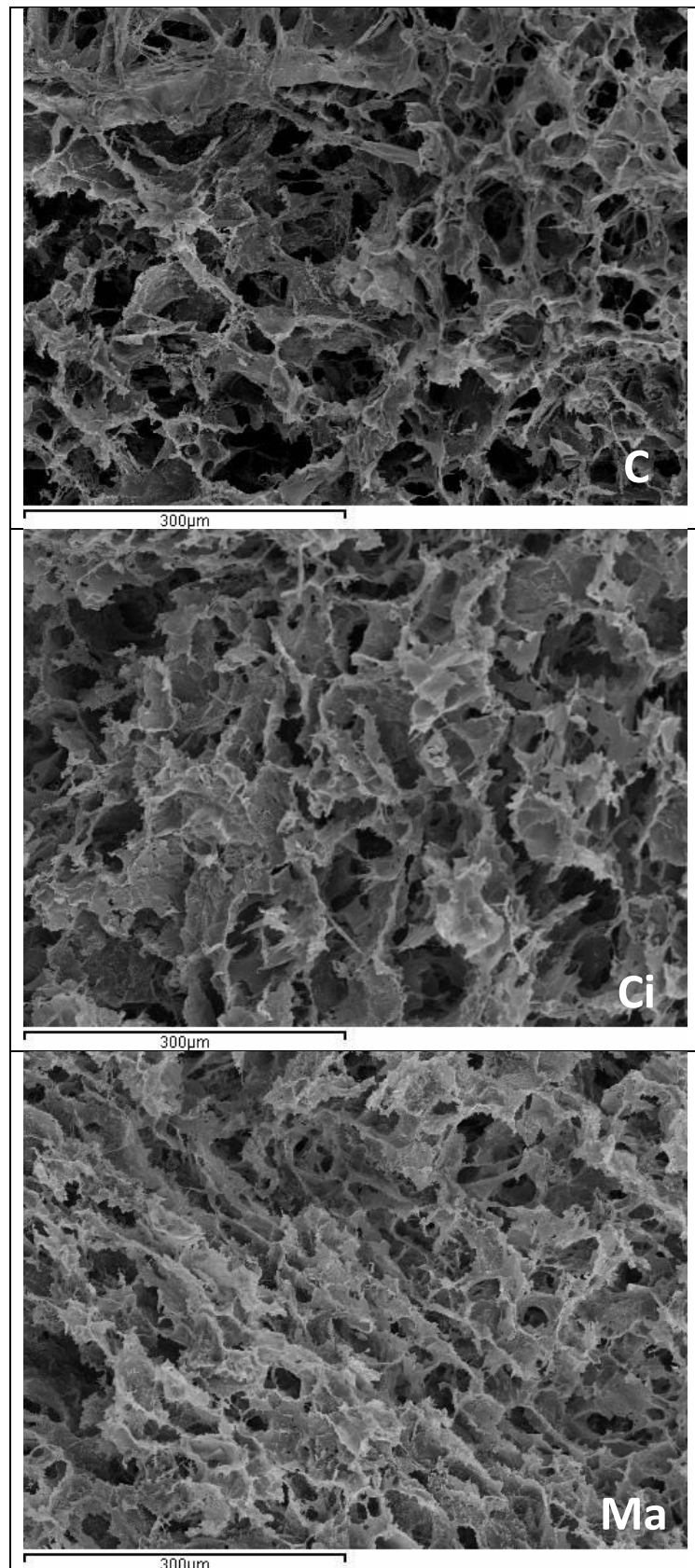


FIGURA 3. Imágenes de SEM de los hidrogeles secos.

La Figura 4 muestra los espectros FTIR de los hidrogeles liofilizados donde pueden observarse las típicas bandas de vibración (*st*) de los grupos -OH en todos los casos a 3300 cm^{-1} y bandas a 1140, 1090 y 1020 que pueden atribuirse a la vibración de los grupos éter (C-O-C), con diferentes intensidades relativas en las tres muestras. No obstante, es remarcable que no se aprecia la banda intensa de vibración (*st*) del grupo carbonilo (C=O) entre 1800 y 1650 en las muestras tratadas con ácidos, la cual aparece apenas pronunciada. Esto sugiere que en el proceso de entrecruzado, el carbonilo del grupo éster esperado, a partir del carboxilo de los ácidos con los -OH de los polímeros, podría reaccionar también con los grupos -OH para dar lugar a enlaces acetálicos (C-O-C) con las cadenas, contribuyendo aún más al grado de entrecruzado entre ellas. En este sentido, cabe destacar la diferente intensidad relativa de las bandas de vibración de los grupos C-O-C en las diferentes muestras. El hidrogel formado sin ácidos presenta una menor intensidad de la banda a 1140, que puede asignarse con mayor probabilidad a grupos éter no cíclicos, y mayor intensidad en las bandas a 1090 y 1020 atribuibles a los éteres cíclicos como los presentes en las cadenas de almidón. Así mismo, se observa un cambio en la intensidad relativa de estas dos bandas en las muestras tratadas con ácido respecto a los hidrogeles control, lo que sugiere cambios en la estereoquímica de los grupos oxi, asociados a las reacciones de entrecruzado. En consecuencia, los espectros FTIR confirman el mayor nivel de entrecruzado de las cadenas en las muestras tratadas con ácido, tal como se deduce de las imágenes de SEM.

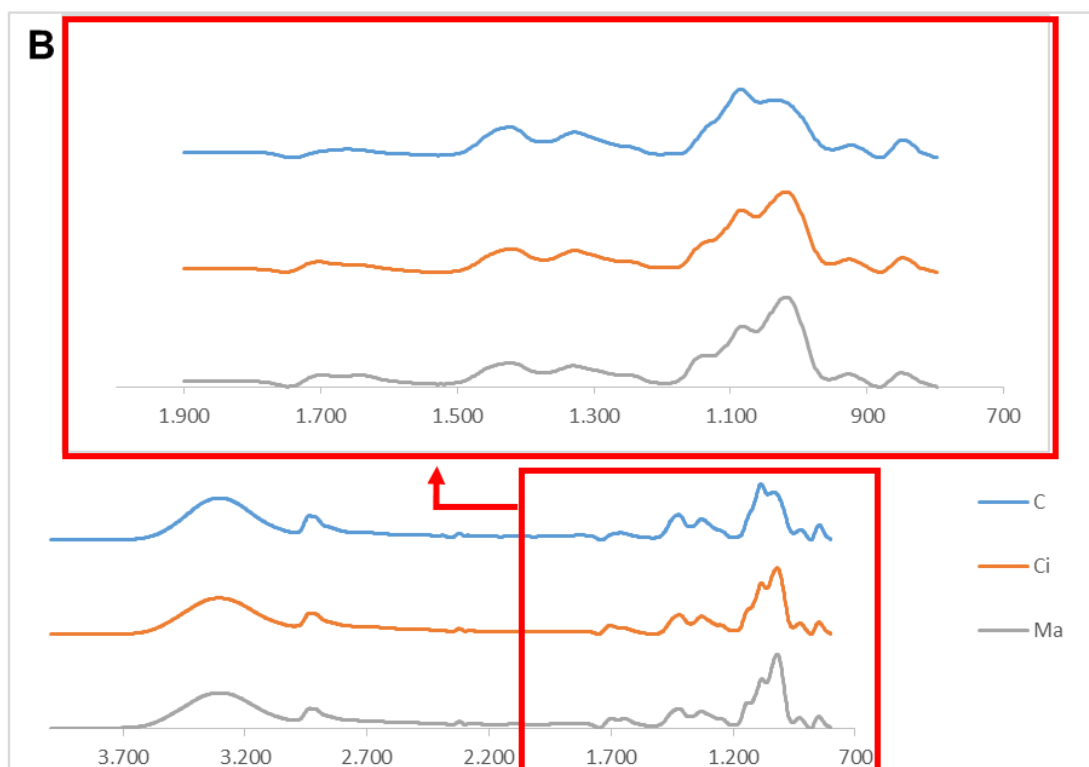


FIGURA 4. Espectros FTIR de los Hidrogeles liofilizados.

En definitiva, el análisis de la micro y nanoestructura de los hidrogeles permitió identificar diferencias entre ellos que pueden afectar a las interacciones respectivas con la fase acuosa impregnada y a la cinética de liberación de los compuestos activos.

3.2.2. Propiedades de impregnación de los hidrogeles.

Mediante el estudio de la capacidad de hinchamiento de los hidrogeles se puede determinar la cantidad de dispersión que absorben y, por tanto, la cantidad de sustancia activa que contienen una vez impregnados.

La Figura 5 muestra el porcentaje de hinchamiento (% de impregnación) de los hidrogeles con las dispersiones de gelatina y gelatina-CEO. Se observa que las muestras alcanzan porcentajes del orden de 1000 %, tal y como observaron Hsieh & Liao (2013) en estudios de la proporción de hinchamiento de hidrogeles de almidón y PVA con agua destilada. Para llegando el hidrogel control el nivel de impregnación fue del 1400 % en el presente trabajo. La diferencia del nivel de hinchamiento entre el hidrogel control y los tratados con ácidos se debe, principalmente, a las diferencias en el tamaño de los poros observadas en las micrografías del SEM asociadas con las reacciones de entrecruzado de los polímeros.

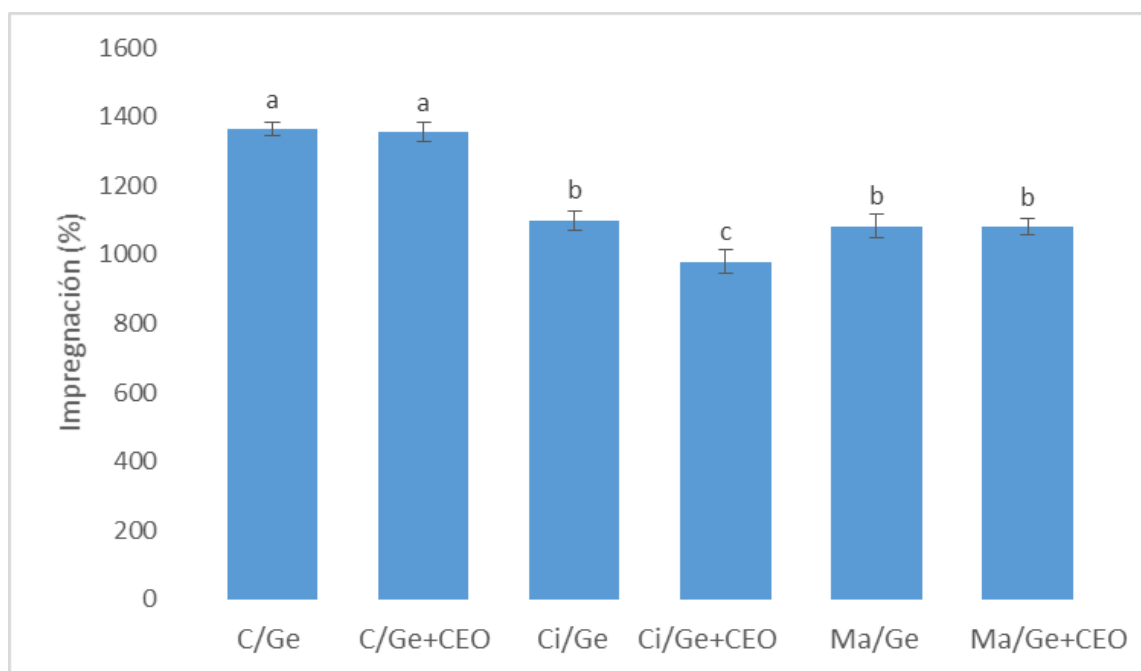


FIGURA 5. Porcentaje de hinchamiento (g de emulsión/ 100 g de hidrogel seco) de los hidrogeles con la emulsión de disolución de gelatina (Ge) y con la emulsión de aceite esencial de canela en gelatina (Ge+CEO). Misma letra indica grupos homogéneos ($p < 0,05$).

A partir del % de impregnación se determinó la cantidad de compuesto activo introducido en las muestras de hidrogeles utilizados para el envasado de manzana cortada. En la Tabla 2 se muestran los valores la masa de aceite esencial de canela (CEO) presente en cada hidrogel después de la impregnación. Se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el hidrogel control y los tratados con ácidos, siendo los valores de estos menores que para el hidrogel control debido a su menor tasa de impregnación.

TABLA 2. Masa del hidrogel seco, masa del líquido impregnado y masa del aceite esencial de canela en los hidrogeles utilizados en el envasado de manzana para el estudio microbiológico. Misma letra indica grupos homogéneos ($p < 0,05$).

Hidrogel	m _{seco} (g)	m _{líq. impregnación} (g)	m _{CEO} (g)
C	0,41 ± 0,02 ^a	5,56 ± 0,17 ^a	0,109 ± 0,003 ^a
Ci	0,42 ± 0,02 ^a	4,11 ± 0,28 ^b	0,081 ± 0,005 ^b
Ma	0,41 ± 0,01 ^a	4,43 ± 0,23 ^b	0,087 ± 0,005 ^b

3.3. Actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* inoculada en manzana cortada.

El estudio microbiológico llevado a cabo en manzana cortada inoculada con *Listeria innocua* (Figura 6) permite analizar la liberación del activo desde los diferentes hidrogeles al espacio de cabeza del envase a diferentes días de almacenamiento a 10 °C.

Como se puede observar, en los hidrogeles con gelatina sin CEO, se da un crecimiento de la bacteria, aumentando las UFC/g manzana a lo largo del tiempo hasta alcanzar un límite máximo de crecimiento de 10⁸ UFC/g aproximadamente a los 5 días. Para las muestras almacenadas con los hidrogeles impregnados con gelatina-CEO, se observa una inhibición del crecimiento en todos los casos, pero con diferencias entre las diferentes muestras a cada tiempo. A los 2 días la mayor inhibición se observa para las muestras con el hidrogel control, de poros más anchos, mientras la menor se da para las muestras con los hidrogeles tratados con ácido maleico, de poros más finos. Esto sugiere una mayor liberación del activo en el hidrogel con poros más anchos. El día 5 se observa una disminución significativa de las UFC/g respecto a los controles ($> 2 \log$ (CFU/g)) en las muestras con los

hidrogeles control (C) y el tratado ácido cítrico, obteniendo los mismos recuentos en ambos casos, e inferiores a los obtenidos en las muestras con el hidrogel tratado con ácido maleico. Para este último se mantiene la misma población que a los dos días, inferior al recuento de la muestra control almacenada sin activo. Sin embargo, a los 8 días, los recuentos en las muestras almacenadas con los hidrogeles control y cítrico impregnados con el activo se igualan a los de las muestras control mientras que para las muestras con el hidrogel activo tratado con ácido maleico, la población se redujo a los valores iniciales, indicando una acción biocida del activo, ya que se reduce la población respecto a los 5 días de almacenamiento.

Estos resultados revelan que el tamaño de los poros de los hidrogeles y el nivel de entrecruzamiento de las cadenas afecta de manera relevante a la cinética de liberación del compuesto activo impregnado, siendo esta más lenta a medida que se dan más enlaces entre los polímeros. La difusión de los compuestos a través de la matriz está muy afectada por la tortuosidad de las vías de difusión (poros) y por tanto, dependiendo del tiempo de acción requerida, ha de seleccionarse la matriz. En el caso de los hidrogeles estudiados, los obtenidos con solo almidón-PVA y con tratamiento con ácido cítrico dejan de ser activos a los 8 días de almacenamiento mientras el tratado con ácido maleico comienza a liberar activo de forma efectiva a los 5 días y mantienen su actividad a los 8 días. En este caso, la combinación de dos hidrogeles de diferente tamaño de poro, uno de liberación rápida y otro lenta podría inhibir el crecimiento bacteriano de forma más efectiva, alargando de forma significativa la vida útil del producto, sin contacto directo con el mismo, por tratarse el activo de compuestos volátiles que difunden al espacio de cabeza del envase.

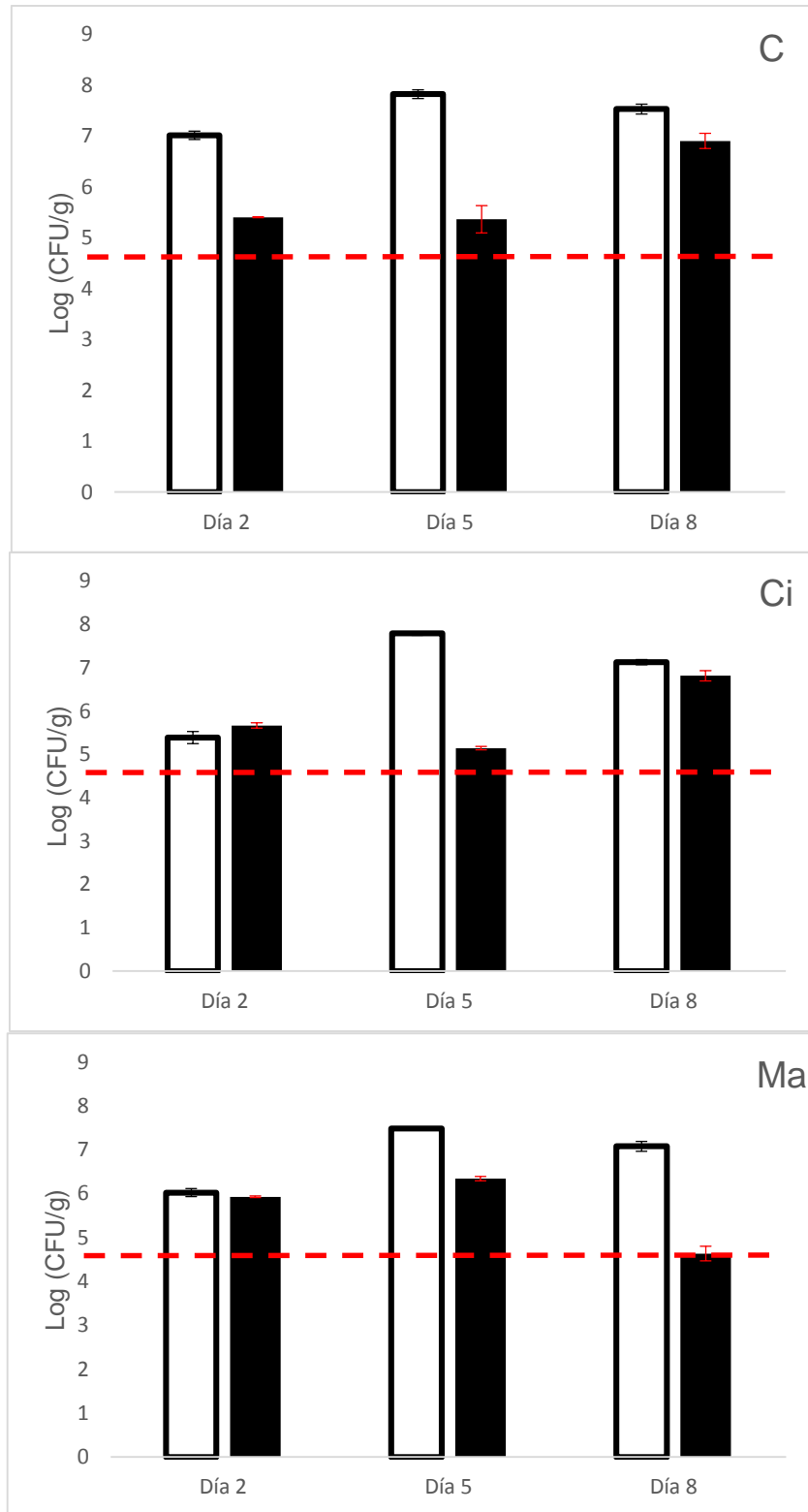


FIGURA 6. Recuentos de UFC/g de *L. innocua* en las muestras de manzana almacenadas a 10°C con hidrogeles impregnados con gelatina (barra blanca) y gelatina-CEO (barra negra). Misma letra en gelatina-CEO indica grupos homogéneos para cada tiempo de control ($p < 0,05$). La línea roja indica la población inicial a día 0.

4. Conclusión.

Es posible obtener hidrogeles de almidón-PVA por ciclos de congelación-descongelación de las disoluciones, obteniendo matrices más compactas con menor tamaño de poro cuando éstas son tratadas con ácidos policarboxílicos para fomentar la formación de enlaces intercadena. Con esta mezcla polimérica, el tratamiento con ácido maleico proporcionó un mayor nivel de entrecruzado en la matriz originando poros más finos. Los hidrogeles tratados con ácido se impregnaron en menor proporción con las dispersiones de los compuestos activos debido a su diferente microestructura. Ésta afectó también a la cinética de liberación de los compuestos activos, que fue más lenta a medida que disminuyó el tamaño de poros del hidrogel, según se deduce de su efectividad antimicrobiana en función del tiempo de almacenamiento. La combinación de dos tipos de hidrogeles con diferente cinética de liberación podría ser una buena estrategia para asegurar una concentración constante del activo en el espacio de cabeza del envase durante un tiempo más largo, permitiendo alargar más la vida útil del producto.

5. Referencias.

- Acticospack project. (2014). <http://www.acticospack.eu/> Consulta 08/06/2015.
- Ahvenainen, R. (2000). Ready-to-use fruit and vegetables. Technical Manual F-FE 376A/00. Flair-Flow Europe. 10 pp.
- Almenar, E., Catalá, R., Hernández-Muñoz, P., & Gavara, R. (2009). Optimization of an active package for wild strawberries based on the release of 2-nonanone. *LWT – Food Science and Technology*, 42 (2), 587-593.
- Bettini, R., Colombo, P., & Peppas, N.A. (1995). Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: Transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *Journal of Controlled Release*, 37 (1-2), 105-111.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 223-253.
- Çiçek, H., & Tuncel, A. (1998). Immobilization of α -chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroxyethylmethacrylate copolymer gel. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36 (4), 543-552.
- Choi, S.S., & Regenstein, J.M. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 65 (2), 194-199.
- Comisión Europea. (2009). Reglamento (CE) No 450/2009 de la Comisión de 29 de mayo de 2009 sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Easyfruit project. (2015). <http://www.easyfruit.eu/> Consulta 08/06/2015.
- Fleming-Jones, M.E., Smith, R.E. (2003). Volatile organic compounds in foods: a five year study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 8120-8127.
- Gao, Y., Xu, S., Wu, R., Wang, J., Wei, J. (2008). Preparation and characteristic of electric stimuli responsive hydrogel composed of polyvinyl alcohol/poly(sodium maleate-co-sodium acrylate). *Journal of Applied Polymer Science*, 107, 391–395.
- Gao, Y. & Xiao, C. (2005). Preparation and characterization of starch-g-PVA/nano-hydroxyapatite complex hydrogel. *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, 20, 58-59.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., & Montero, P. (2005). The role of salt washing of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. *Food Hydrocolloids*, 19 (6), 951-957.

- Hennink, W.E., & van Nostrum, C.F. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (1), 13-36.
- Hsieh, W. & Liao, J. (2013). Cell culture and characterization of cross-linked poly(vinyl alcohol)-g-starch 3D scaffold for tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, 98, 574-580.
- IFPA (2015) International Fresh-cut Produce Association. <http://www.fresh-cuts.org/> Consulta 04/06/2015
- Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. & Tehrany, E. A. (2014). Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35 (159-169).
- Kosegarten-Conde, C. E. & Jiménez-Munigua, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6 (2), 1-18.
- Liang, H., Yuan, Q., Vriesekoop, F., Lv, F. (2012). Effects of cyclodextrins on the antimicrobial activity of plant-derived essential oil compounds. *Food Chemistry*, 135 (3), 1020-1027.
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starch. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 318–332). London: Elsevier Academic Press.
- Lourdin, D., Della Valle, G., & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27 (4), 261-270.
- Lowman, A.M., & Peppas, N.A. (1999). Hydrogels, In: E. Mathiowitz, (Ed.), *Encyclopedia of controlled drug delivery*, Wiley, New York, pp. 397-418.
- Narendra, R. & Yiqi, Y. (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118, 702-711.
- Pang, S.C., Chin, S.F., Tay, S.H., Tchong, F.M. (2011). Starch-maleate-polyvinyl alcohol hydrogels with controllable swelling behaviors. *Carbohydrate Polymers*, 84 (1), 424-429.
- Peppas, N.A. (Ed.). (1986). *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. I, II, III, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Peppas, N.A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J.H., & Zhang, J. (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2, 9-29.
- Peppas, N.A., & Stauffer, S.R. (1991). Reinforced uncrosslinked poly (vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review. *Journal of Controlled Release*, 16 (3), 305-310.
- Perdones, A., Vargas, M., Atarés, L., & Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36, 256-264.
- Soliva-Fortuny, R.,C., & Martín-Belloso, O. (2003). New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 14 (9), 341-353.
- Xiao, C. & Yang, M. (2006). Controlled preparation of physical cross-linked starch-g-PVA hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, 64 (1), 37-40.
- Zhang, H. Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C. J. F., Ponçot, M., Linder, M., & Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soy, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 618e627.