



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS D'ALCOI

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Alcoy

Desarrollo y caracterización de films halocrómicos
derivados de proteína de zeína con enocianinas para
monitorización del deterioro de alimentos frescos
envasados

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ingeniería, Procesado y Caracterización de
Materiales

AUTOR/A: Llinares Verdú, Andreu

Tutor/a: Balart Gimeno, Rafael Antonio

Cotutor/a: Gómez Caturla, Jaume

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

RESUMEN

“Desarrollo y caracterización de films halocrómicos derivados de proteína de zeína con enocianinas para monitorización del deterioro de alimentos frescos envasados”

En las últimas décadas, el uso de materiales poliméricos ha experimentado un crecimiento exponencial. El mayor volumen de polímeros se destina al sector de envase/embalaje de alimentos. Considerando la relevancia que han adquirido los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), incidir en el desarrollo de polímeros de bajo impacto medioambiental representa una alternativa viable que puede contribuir de forma positiva a la transición de las economías lineales a circulares. En este sentido, los biopolímeros han ganado gran interés en los últimos años. El sector del envasado de alimentos también ha evolucionado, ofreciendo soluciones más allá del propio envase. Es el caso de los envases activos o los envases inteligentes. Los envases inteligentes proporcionan al consumidor y, en general, a toda la cadena, información sobre el estado del producto envasado, permitiendo identificar, de forma sencilla, el estado del producto y si se ha mantenido de forma apropiada desde la producción hasta que llega al consumidor.

El objetivo central de este trabajo es el desarrollo de films inteligentes para el sector del envase/embalaje. Considerando la relevancia de los biopolímeros y su bajo impacto medioambiental, se han desarrollado nuevos materiales capaces de actuar como sensores de pH (materiales halocrómicos) en productos frescos, ya que los procesos de deterioro de los alimentos frescos generan compuestos ácidos o básicos, que pueden modificar el pH del entorno. El trabajo aborda la fabricación de films o películas con base de proteína de zeína plastificada con glicerol, y la incorporación de enocianinas, o antocianinas derivadas de la piel de la uva morada, que presentan un comportamiento halocrómico. Con ello, se pretende ofrecer una solución técnica que pueda implementarse como control de calidad en pescado fresco, ya que el cambio de color producido en los films desarrollados, debido a los productos de la descomposición de los alimentos frescos, en este caso, a las aminas, permite una fácil identificación del estado real del alimento envasado.

En este trabajo se aborda una caracterización inicial del comportamiento halocrómico de las enocianinas en un rango de pH comprendido entre 2 y 13, que incluye una valoración visual de los cambios de color, así como una cuantificación mediante espectroscopía UV-Vis. Una vez cuantificado el comportamiento halocrómico, se han desarrollado formulaciones de films con proteína de zeína, plastificada con glicerol (20 % en peso), con diferentes contenidos en enocianinas en el rango 1,5 - 6,0 % en peso en relación con el contenido de zeína. Para la fabricación de los films halocrómicos, se ha empleado la técnica de *solvent casting* dada la facilidad que ofrece en la obtención de películas finas. El trabajo incluye una completa caracterización de los materiales desarrollados que abarca sus propiedades mecánicas, térmicas, absorción de humedad, humectabilidad superficial, color, entre otras, así como el estudio del efecto del contenido de enocianinas en el conjunto de propiedades descrito. En la fase final se aborda la aplicación de estos sensores/indicadores de pH mediante la realización de una caracterización *in vitro* del cambio de color derivado de la exposición a los vapores de una disolución de amoníaco, y en condiciones *in vivo*, con los cambios de color derivados de la descomposición de pescado fresco, ya que las aminas resultado de la descomposición, contribuyen a un incremento de PH, que lleva asociado un cambio de color fácilmente detectable por el sensor de base zeína con enocianinas. Este trabajo, pone de manifiesto la relevancia que pueden tener los films con aditivos de enocianinas, en el control de calidad de producto fresco, como el pescado. Además, se trata de materiales que ofrecen una total biodegradación (desintegración en compost) en un período relativamente corto, inferior a 30 días.

Palabras clave: films inteligentes; enocianinas; alimentos frescos; halocrómico; pH; zeína

SUMMARY

“Development and characterization of halochromic films derived from zein protein with enocyanins for monitoring spoilage of fresh packaged foods”

In recent decades, the use of polymeric materials has experienced exponential growth. The largest volume of polymers is used to the food packaging sector. Considering the significance of the sustainable development goals (SDGs), focusing on the development of low environmental impact polymers represents a viable alternative that can positively contribute to the transition from linear to circular economies. In this regard, biopolymers have gained significant interest in recent years. The food packaging sector has also evolved, offering solutions beyond mere packaging. This is the case with active packaging or smart packaging. Smart packaging provides consumers and, generally, the entire supply chain with information about the condition of the packaged product, allowing easy identification of the product's state and whether it has been properly maintained from production until it reaches the consumer.

The main objective of this work is the development of smart films for the packaging sector. Considering the relevance of biopolymers and their low environmental impact, new materials capable of acting as pH sensors (halochromic materials) in fresh products have been developed, since the deterioration processes of fresh foods generate acidic or basic compounds that can modify the surrounding pH. The work addresses the fabrication of films based on zein protein plasticized with glycerol, and the incorporation of enocyanins, or anthocyanins derived from the skin of purple grapes, which exhibit halochromic behavior. This aims to offer a technical solution that can be implemented as a quality control measure in fresh fish, as the color change produced in the developed films due to the decomposition products of fresh foods, in this case, amines, allows easy identification of the actual state of the packaged food.

This work provides an initial characterization of the halochromic behavior of enocyanins over a pH range of 2 to 13, including a visual assessment of color changes and quantification through UV-Vis spectroscopy. Once the halochromic behavior was

quantified, formulations of films with zein protein plasticized with glycerol (20 % by weight) were developed, with different enocyanin contents in the range of 1.5 - 6.0% by weight relative to the zein content. The solvent casting technique was employed for the fabrication of the halochromic films, given its ease in obtaining thin films. The work includes a comprehensive characterization of the developed materials, covering their mechanical, thermal properties, moisture absorption, surface wettability, color, among others, as well as the study of the effect of enocyanin content on the described set of properties. In the final phase, the application of these pH sensors/indicators is addressed through an *in vitro* characterization of the color change derived from exposure to ammonia solution vapors, and *in vivo* conditions, with the color changes resulting from the decomposition of fresh fish, since the amines resulting from decomposition contribute to a pH increase, leading to a color change easily detectable by the zein-based sensor with enocyanins. This work highlights the relevance that films with enocyanin additives can have in the quality control of fresh products, such as fish. Moreover, these materials offer complete biodegradation (disintegration in compost) within a relatively short period, less than 30 days.

Keywords: intelligent films; enocyanins; fresh foods; chromic halo; pH; zein

RESUM

“Desenvolupament i caracterització de pel·lícules halocròmiques derivades de proteïna de zeïna amb enocianines per a la monitorització del deteriorament d'aliments frescos envasats”

En les últimes dècades, l'ús de materials polimèrics ha experimentat un creixement exponencial. El major volum de polímers es destina al sector d'envàs/embalatge d'aliments. Considerant la rellevància que han adquirit els objectius de desenvolupament sostenible (ODS), incidir en el desenvolupament de polímers de baix impacte mediambiental representa una alternativa viable que pot contribuir de forma positiva a la transició de les economies lineals a circulars. En aquest sentit, els biopolímers han guanyat gran interès en els últims anys. El sector de l'envasament d'aliments també ha evolucionat, oferint solucions més enllà del propi envàs. És el cas dels envasos actius o els envasos intel·ligents. Els envasos intel·ligents proporcionen al consumidor i, en general, a tota la cadena, informació sobre l'estat del producte envasat, permetent identificar, de forma senzilla, l'estat del producte i si s'ha mantingut de forma apropiada des de la producció fins que arriba al consumidor.

L'objectiu central d'aquest treball és el desenvolupament de films intel·ligents per al sector de l'envàs/embalatge. Considerant la rellevància dels biopolímers i el seu baix impacte mediambiental, s'han desenvolupat nous materials capaços d'actuar com a sensors de pH (materials halocròmics) en productes frescos, ja que els processos de deteriorament dels aliments frescos generen compostos àcids o bàsics, que poden modificar el pH de l'entorn. El treball aborda la fabricació de films o pel·lícules amb base de proteïna de zeïna plastificada amb glicerol, i la incorporació d'enocianines, o antocianines derivades de la pell del raïm morat, que presenten un comportament halocròmic. Amb això, es pretén oferir una solució tècnica que es pugui implementar com a control de qualitat en peix fresc, ja que el canvi de color produït en els films desenvolupats, degut als productes de la descomposició dels aliments frescos, en aquest cas, amines, permet una fàcil identificació de l'estat real de l'aliment envasat.

En aquest treball s'aborda una caracterització inicial del comportament halocròmic de les enocianines en un rang de pH comprés entre 2 i 13, que inclou una valoració visual dels canvis de color, així com una quantificació mitjançant espectroscòpia UV-Vis. Una vegada quantificat el comportament halocròmic, s'han desenvolupat formulacions de films amb proteïna de zeïna, plastificada amb glicerol (20 % en pes), amb diferents continguts en enocianines en el rang 1,5 - 6,0 % en pes en relació amb el contingut de zeïna. Per a la fabricació dels films halocròmics, s'ha emprat la tècnica de *solvent casting* donada la facilitat que ofereix en l'obtenció de pel·lícules fines. El treball inclou una completa caracterització dels materials desenvolupats que abasta les seues propietats mecàniques, tèrmiques, absorció d'humitat, humectabilitat superficial, color, entre d'altres, així com l'estudi de l'efecte del contingut d'enocianines en el conjunt de propietats descrit. En la fase final s'aborda l'aplicació d'aquests sensors/indicadors de pH mitjançant la realització d'una caracterització *in vitro* del canvi de color derivat de l'exposició als vapors d'una dissolució d'amoníac, i en condicions *in vivo*, amb els canvis de color derivats de la descomposició de peix fresc, ja que les amines resultat de la descomposició, contribueixen a un increment de pH, que porta associat un canvi de color fàcilment detectable pel sensor de base zeïna amb enocianines. Aquest treball, posa de manifest la rellevància que poden tindre els films amb additius d'enocianines, en el control de qualitat de producte fresc, com el peix. A més, es tracta de materials que ofereixen una total biodegradació (desintegració en compost) en un període relativament curt, inferior a 30 dies.

Paraules claus: films intel·ligents; enocianines; aliments frescos; halocròmic; pH; zeïna

Tabla de Contenidos

RESUMEN.....	1
SUMMARY	3
RESUM.....	5
ABREVIATURAS.....	11
LISTADO DE FIGURAS.....	15
LISTADO DE TABLAS.....	19
I. INTRODUCCIÓN	21
I.1. Polímeros y medio ambiente.....	23
I.1.1. Polímeros y medio ambiente.....	23
I.1.2. Clasificación de polímeros según criterios medioambientales.	26
I.2. Polímeros en el sector envase/embalaje.....	28
I.2.1. Uso de polímeros en el sector envase/embalaje de alimentos.	29
I.2.2. Envasado inteligente o <i>smart-packaging</i>	32
I.3. Fenómenos de halocromía y monitorización del pH.	38
I.3.1. Halocromía.	38
I.3.2. Compuestos con comportamiento halocrómico.	39
I.4. Films poliméricos con comportamiento halocrómico.	44
I.5. Estructura y aplicaciones de la zeína en el sector envasado.....	46
I.5.1. Niveles de organización estructural de las proteínas.....	47
I.5.2. Proteína de maíz: Zeína.	48
I.5.3. Aplicaciones de la zeína en el envasado de alimentos.	50
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53

II.1. Hipótesis de trabajo.	55
II.2. Objetivos.	56
II.2.1. Objetivo general.	56
II.2.2. Objetivos particulares.	56
II.3. Metodología y planificación.	57
III. EXPERIMENTAL	63
III.1. Materiales.	65
III.2. Caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.	65
III.3. Proceso de fabricación.	66
III.4. Técnicas y ensayos de caracterización.	67
III.4.1. Caracterización mecánica.....	67
III.4.2. Caracterización térmica.....	68
III.4.3. Caracterización morfológica.	69
III.4.4. Caracterización superficial.....	70
III.4.5. Otras técnicas de caracterización.....	74
III.4.6. Validación de los indicadores halocrómicos.	76
III.4.7. Estudio de la biodegradabilidad de los indicadores halocrómicos. .	78
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
IV.1. Caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.	83
IV.2. Caracterización de los films con comportamiento halocrómico.	85
IV.2.1. Caracterización mecánica.	85
IV.2.2. Caracterización térmica.....	87

IV.2.3. Caracterización morfológica.....	92
IV.2.4. Caracterización superficial.	94
IV.2.5. Otras técnicas de caracterización.....	100
IV.3. Validación de los indicadores halocrómicos.....	105
IV.3.1. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones <i>in vitro</i>	105
IV.3.2. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones <i>in vivo</i>	107
IV.4. Estudio de la biodegradabilidad de los indicadores halocrómicos.....	110
V. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.....	113
V.1. Conclusiones.....	115
V.2. Líneas futuras.....	117
REFERENCIAS.....	119
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	125

ABREVIATURAS

a^*	Coordenada colorimétrica correspondiente a colores verde-rojo
b^*	Coordenada colorimétrica correspondiente a colores amarillo-azul
BioPA	Bio poliamidas
BioPC	Bio policarbonato
BioPE	Bio polietileno
BioPET	Bio polietilén tereftalato
BioPP	Bio polipropileno
BioPS	Bio poliestireno
BioPUR	Bio poliuretano
CB	Bentonita de calcio
cm	Centímetros
CMC	Carboximetilcelulosa
DMA	Dimetilamina
DSC	Calorimetría diferencia de barrido
DTG	Primera derivada del TGA
E	Módulo de Young [MPa]
Eno	Enocianinas
FESEM	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
g	Gramos

h	Horas
L^*	Coordenada colorimétrica correspondiente a la luminosidad
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Mt	Millones de toneladas
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
PA	Poliamida
PBAT	Polibutilén adipato-co-tereftalato
PBS	Polibutilén succinato
PBSA	Polibutilén succinato-co-adipato
PBT	Polibutilén tereftalato
PC	Policarbonato
PCL	Policaprolactona
PDO	Polidioxanona
PE	Polietileno
PEG	Polietilenglicol
PEEK	Poliéter éter cetona
PEI	Poliéter imida
PEK	Poliéter cetona
PES	Poliéter sulfona

PET	Polietilén tereftalato
PGA	Ácido poliglicólico
PHA	Polihidroxicanoatos
PHB	Polihidroxiacetato
PHBH	Polihidroxiacetato-co-hexanoato
PHBV	Polihidroxiacetato-co-valerato
PHO	Polihidroxi octanoato
PLA	Ácido poliláctico
POM	Polióxido de metileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PU	Poliuretanos
PVA	Poli(alcohol vinílico)
PVC	Policloruro de vinilo
RDIF	Identificación por radio frecuencia
T _{5%}	Temperatura correspondiente a la pérdida del 5 % de masa [°C]
T ₆₀₀	Transmitancia a una longitud de onda de 600 nm [%]
T _g	Temperatura de transición vítrea [°C]
TGA	Análisis termogravimétrico
TMA	Trimetilamina
T _{máx}	Temperatura máxima de degradación [°C]
TTI	Indicador tiempo-temperatura

TVB-N	Nitrógeno Básico Volátil Total
x	Espesor de la película [mm]
θ	Ángulo de contacto [°]
w	Peso de las muestras [mg]
$\sigma_{m\acute{a}x}$	Resistencia a la tracción [MPa]
ε	Alargamiento a la rotura [%]
ΔE	Diferencia de color total
°C	Grados centígrados
μm	Micrómetro

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de plásticos 2018-2022. Adaptado de: Plastics Europe: Plastics – the fast Facts 2023.	24
Figura 2. Clasificación de materiales poliméricos termoplásticos desde una perspectiva medioambiental, según su origen (petroquímico o renovable) y el final de su ciclo de vida (biodegradable o no biodegradable).	26
Figura 3. Producción de productos plásticos por sectores a nivel europeo en 2022. Adaptado de: Plastics Europe: Plastics – the fast Facts 2023.	28
Figura 4. Formulación de la estructura química de los principales polímeros de origen petroquímico utilizados en el sector envasado/embalaje de alimentos.	30
Figura 5. SensorQ <i>TM</i> ; Vitsab L5-8 TTI Seafood label.	33
Figura 6. a) Sensores O2xyDot; b) Sistema de medición de O ₂	34
Figura 7. Etiqueta indicadora desarrollada por la compañía To-Genkyo.	37
Figura 8. Transformación estructural y colorimétrica de las antocianinas en diferentes soluciones tampón. Adaptado de: [35].	41
Figura 9. Enocianinas en forma de polvo extraídas de la piel de la uva morada. Fuente: Europages.	42
Figura 10. Transformación estructural y colorimétrica de curcumina en función del pH. Adaptado de: [24].	43
Figura 11. Formación del enlace peptídico entre aminoácidos.	47
Figura 12. Representación esquemática de los niveles de organización de las estructuras proteicas o proteínas.	47
Figura 13. Esquema gráfico de planificación.	62
Figura 14. Equipo de tracción Ibertest DUOTRAC-10/1200.	67
Figura 15. Equipo DSC 25 de TA Instruments.	68
Figura 16. Equipo TGA 2 SF de Mettler Toledo.	69
Figura 17. Equipo ZEISS ULTRA 55 FESEM de Oxford Instruments.	70

Figura 18. Colorímetro A Konica CM3600d Colorflex-DIFF2 de Hunter Associates Laboratory, Inc.	71
Figura 19. Espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 de Agilent Technologies.	72
Figura 20. Micrómetro de Kalkum Ezquerra.	72
Figura 21. Goniómetro óptico EasyDrop Standard FM140.....	73
Figura 22. Espectrómetro FTIR Spectrum Two de Perkin Elmer.	74
Figura 23. Colocación de las películas halocrómicas durante el ensayo de validación en condiciones in vitro.....	76
Figura 24. Colocación de las películas halocrómicas durante el ensayo de validación en condiciones in vivo.	78
Figura 25. Preparación de las muestras para la realización de los ensayos de biodegradación.....	79
Figura 26. Caracterización óptica del comportamiento halocrómico de las encianinas para valores de pH de 2 a 13.	83
Figura 27. Espectros UV-Vis de las disoluciones de encianinas obtenidas con un rango de pH de 2 a 13.....	84
Figura 28. Representaciones gráficas de la variación de las propiedades mecánicas de las películas de zeína con diferentes composiciones de encianinas.....	86
Figura 29. Curvas calorimétricas de las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas, obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	88
Figura 30. Gráfico TGA variación de la masa de las muestras con la temperatura.	90
Figura 31. Gráfico DTG variación de la velocidad de degradación de las muestras con la temperatura.	90
Figura 32. Morfología de las superficies de fractura de las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas (% en peso): a) 0, b) 1,5, c) 3, d) 4,5 y e) 6. Barra de escala 2 μm	92
Figura 33. Imágenes de las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas, obtenidas mediante fotografía óptica.	94
Figura 34. Representación gráfica de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab de las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas.....	95

Figura 35. Representación gráfica de la variación de la transmitancia y transparencia de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	97
Figura 36. Representación gráfica de la variación del ángulo de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	99
Figura 37. Espectros FTIR de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	100
Figura 38. Representación gráfica de la variación del contenido de humedad de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	102
Figura 39. Representación gráfica de la variación de la solubilidad en agua de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	104
Figura 40. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante la validación en condiciones in vitro.	105
Figura 41. Representaciones gráficas de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab y de la diferencia total de color durante la validación en condiciones in vitro.	106
Figura 42. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante la validación en condiciones in vivo.	108
Figura 43. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante su validación como indicadores de pH en la monitorización de pescado fresco.	108
Figura 44. Representaciones gráficas de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab y de la diferencia total de color durante la validación en condiciones in vivo.	109
Figura 45. Imágenes progresivas del proceso de biodegradación de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	110
Figura 46. Gráfico tensión-deformación unitaria de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	127
Figura 47. Curvas calorimétricas completas de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	128
Figura 48. Imágenes de los ángulos de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	128

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Composición y nomenclatura de las películas de proteína de zeína con diferentes cargas de enocianinas.....	66
Tabla 2. Compuestos y composiciones utilizadas en la preparación del compost para el ensayo de biodegradación.....	79
Tabla 3. Procedimiento y tareas a realizar durante los días de duración del ensayo de biodegradación.....	80
Tabla 4. Resumen de las propiedades mecánicas de las películas de zeína con diferentes composiciones de enocianinas, obtenidas mediante ensayos de tracción.	85
Tabla 5. Temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	88
Tabla 6. Parámetros térmicos de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidos mediante los análisis termogravimétricos.	91
Tabla 7. Coordenadas colorimétricas CIELab de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	95
Tabla 8. Resultados del % de transmitancia, espesor y % de transparencia de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.....	97
Tabla 9. Ángulos de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de, obtenidos mediante goniometría óptica.....	98
Tabla 10. Resultados del contenido en humedad de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	102
Tabla 11. Resultados de la solubilidad en agua de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.	103

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

I.1. Polímeros y medio ambiente.

En las últimas décadas, el uso de materiales poliméricos ha transformado numerosos aspectos de nuestra vida cotidiana. Con el paso del tiempo, estos tipos de materiales han adquirido una gran importancia debido a sus propiedades de ligereza, resistencia, durabilidad y resistencia a la corrosión, todas ellas complementadas por el factor económico [1]; [2].

Además de las excelentes propiedades que presentan, los materiales poliméricos, son materiales muy versátiles, lo que permite producir una gran variedad de productos: incluyendo materiales rígidos y/o flexibles, adhesivos, espumas, fibras, etc. [1].

La combinación de ambos factores contribuye a que los polímeros sean ampliamente utilizados en una gran variedad de sectores tales como la construcción, envasado y embalaje, la industria del automóvil, medicina, electrónica, etc., demostrando su versatilidad y adaptabilidad a diversas aplicaciones. Sin embargo, a pesar de los evidentes beneficios que ofrecen, los materiales poliméricos también se enfrentan a desafíos significativos en términos de impacto ambiental y de gestión de residuos.

I.1.1. Polímeros y medio ambiente.

El último informe publicado por la organización *Plastics Europe* denominado *Plastics – the Fast Facts 2023*, muestra los datos preliminares sobre la producción de plásticos a nivel mundial y europeo. En el siguiente gráfico, se observa la tendencia de la producción de plástico a nivel mundial en el período de tiempo comprendido entre 2018 y 2022, así como la tendencia de la producción de plásticos de origen fósil y biológico y de plásticos reciclados mecánica y químicamente.

I. Introducción

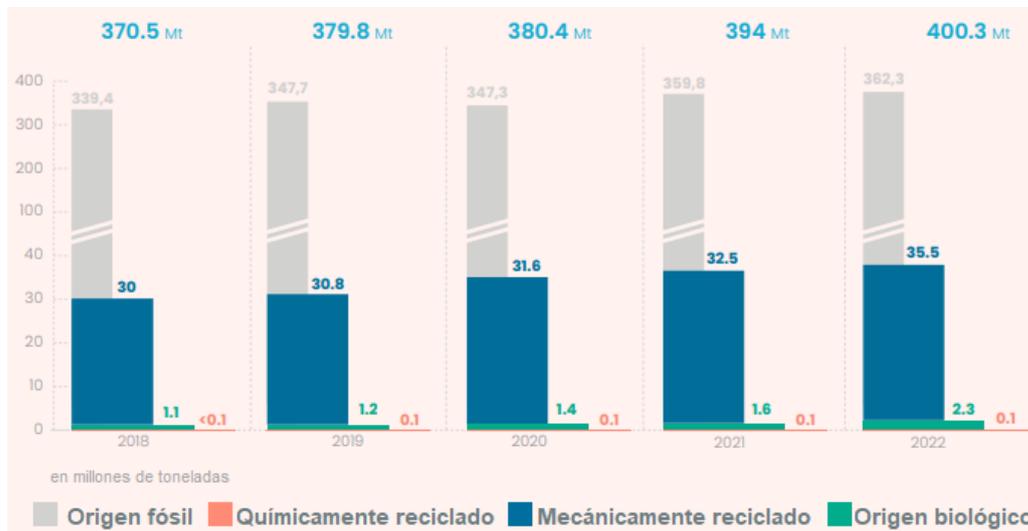


Figura 1. Producción mundial de plásticos 2018-2022. Adaptado de: *Plastics Europe: Plastics – the fast Facts 2023*.

A simple vista, se puede observar cómo la producción de materiales plásticos se ha incrementado un 8,00 % desde el 2018, hasta alcanzar las 400,3 millones de toneladas (Mt) anuales en 2022. A su vez, se observa un ligero crecimiento en la producción de plásticos reciclados y de origen biológico en los últimos años, sin embargo, dicha producción solamente equivale al 10,0 % de la producción total anual en 2022, correspondiendo el 90,0 % restante a la producción de materiales plásticos de origen fósil. A pesar del ligero crecimiento experimentado en el reciclado de materiales plásticos, este sigue siendo muy inferior a la producción, por lo que la gran mayoría de residuos plásticos generados son desechados y eliminados en vertederos.

La gran demanda de materiales plásticos de origen fósil se debe principalmente a su bajo coste de producción y a sus excelentes propiedades, lo que los hacen materiales muy versátiles [3]. Una de las principales propiedades por la que destacan estos materiales es por su durabilidad, la cual permite obtener productos resistentes y de larga vida útil, reduciendo la necesidad de reemplazos frecuentes. Sin embargo, una vez finalizada la vida útil de estos productos, la durabilidad se convierte en una desventaja, ya que, al ser desechados, su tiempo de degradación es muy prolongado.

I. Introducción

La combinación del lento proceso de degradación sumado a la mala gestión de residuos y al continuo vertido de residuos plásticos se han convertido en las principales causa de contaminación ambiental [4], provocando la acumulación de miles de toneladas de residuos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, generando graves impactos en la vida de la flora y fauna que los habitan e, incluso, su muerte.

Cuando los residuos plásticos se acumulan en el medio ambiente, estos sufren procesos físicos, químicos y biológicos que suponen su degradación, lo que transforma dichos residuos en partículas de menor tamaño como los microplásticos (< 5 mm) [5]. La presencia de estas partículas en el medio ambiente supone serios riesgos, no solamente para la flora y fauna en ecosistemas terrestres y marinos, sino también para la salud humana, ya que, se han llegado a detectar estas partículas en alimentos o en el aire [6].

Además de la contaminación generada por la mala gestión y por la acumulación de residuos, durante los procesos de producción y reciclado de materiales plásticos derivados de recursos fósiles se emiten a la atmósfera gases de efecto invernadero como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxidos de nitrógeno (NO_x). Con respecto a la producción de productos plásticos, también cabe resaltar la utilización de una gran variedad de productos tales como aditivos, plastificantes, pigmentos, antioxidantes, etc. de naturaleza potencialmente tóxica en algunos casos que, durante los lentos procesos de degradación, pueden ser liberados y agravar aún más el impacto ambiental generado por los residuos plásticos [7].

A raíz de los numerosos problemas y el grave impacto que implica la contaminación plástica en los ecosistemas y en la salud humana, con el paso de los años, se ha observado una mayor concienciación por parte de la sociedad acerca de temas medioambientales, lo que ha impulsado la investigación y desarrollo de nuevos materiales más sostenibles. En el caso de los materiales poliméricos, estos presentan una gran dependencia de los recursos fósiles; sin embargo, sí que se ha apreciado un gran avance con respecto a los polímeros termoplásticos.

I. Introducción

I.1.2. Clasificación de polímeros según criterios medioambientales.

Desde el punto de vista medioambiental, los polímeros termoplásticos se pueden clasificar según el origen (petroquímico o renovable) y la capacidad de degradación al final de su ciclo de vida (biodegradable o no biodegradable). En la **Figura 2**, se muestra dicha clasificación y algunos ejemplos.

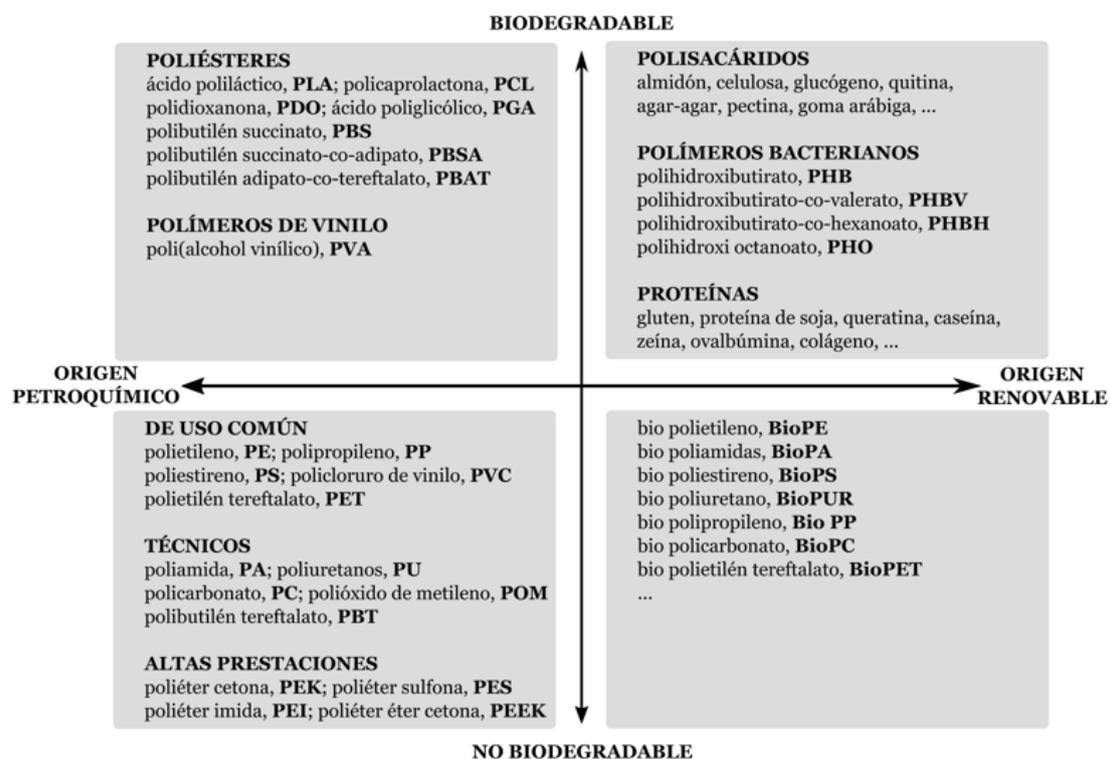


Figura 2. Clasificación de materiales poliméricos termoplásticos desde una perspectiva medioambiental, según su origen (petroquímico o renovable) y el final de su ciclo de vida (biodegradable o no biodegradable).

En la actualidad, los materiales de mayor uso y demanda a nivel industrial son los polímeros de origen petroquímico y no biodegradables, donde se encuentran plásticos de uso común, técnicos y de altas prestaciones. La principal ventaja que aportan estos materiales es su bajo coste de producción, especialmente los polímeros de uso común, y la amplia variedad de propiedades que ofrecen. La combinación de ambas

I. Introducción

ventajas, junto con su versatilidad, ha llevado a una dependencia global de estos materiales en múltiples industrias. Sin embargo, desde el punto de vista medioambiental el impacto generado durante la producción y la eliminación de estos polímeros supone graves riesgos ambientales, tal y como se ha visto anteriormente.

Por esta razón, en los últimos años, se ha incrementado la investigación y estudio de nuevos materiales poliméricos mucho más respetuosos con el medio ambiente, intentando igualar las propiedades y versatilidad de los polímeros de origen petroquímico y no biodegradables. Existen polímeros como los poliésteres o algunos polímeros de tipo vinílico cuyo origen también es petroquímico, pero una vez desechados son biodegradables, por lo que el impacto ambiental generado por estos una vez finalizada su vida útil es mucho menor. La biodegradación es especialmente interesante en los polímeros de tipo poliéster alifático, debido a la labilidad de los grupos éster que se hidrolizan con relativa facilidad en condiciones de compost, favoreciendo la desintegración [8]. El caso contrario ocurre con materiales como el biopolietileno (BioPE) o el biopolipropileno (BioPP) [9], los cuales son de origen renovable, lo que reduce la emisión de gases de efecto invernadero durante su producción, pero no son biodegradables, por lo que una vez desechados pueden llegar a ocasionar serios riesgos ambientales si los residuos generados son mal gestionados. También se contempla en este grupo el polietilén tereftalato biobasado o bioPET, en el que diversos monómeros de origen renovable se emplean para mejorar su rendimiento medioambiental [10].

Por último, cabe destacar el grupo de polímeros más respetuosos desde el punto de vista medioambiental de la clasificación. Este grupo está compuesto por polímeros derivados de polisacáridos como el almidón, la celulosa o la quitina [11]; [12], poliésteres alifáticos derivados de fermentación bacteriana o polihidroxialcanoatos (PHA) [13], como el polihidroxibutirato (PHB) y por polímeros derivados de proteínas como el gluten, la zeína, la queratina, la proteína de soja, etc. [14]. Estos tipos de polímeros se caracterizan por ser producidos a partir de materias primas renovables y por su capacidad de biodegradación, por lo que el impacto ambiental generado por estos es muy inferior al generado por los demás grupos de la clasificación.

I. Introducción

A pesar dichas ventajas, las propiedades de los polímeros de origen renovable y biodegradables, hoy en día, se encuentran muy lejos de las propiedades que presentan materiales como el polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) o el policloruro de vinilo (PVC), por lo que su aplicación a nivel industrial sigue siendo un desafío. Este hecho ha motivado la investigación y estudio de estos polímeros con el fin de mejorar sus propiedades y poder llegar a sustituir a los polímeros de origen petroquímico y no biodegradables en un futuro.

I.2. Polímeros en el sector envase/embalaje.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en la actualidad, debido a sus excelentes propiedades y a su versatilidad y adaptabilidad, los materiales poliméricos son ampliamente utilizados en una gran variedad de sectores. En la **Figura 3**, extraída del informe *Plastics – the Fast Facts 2023* publicado por *Plastics Europe*, se muestra una estimación de la producción de productos poliméricos en diversos sectores a nivel europeo durante el año 2022.



Figura 3. Producción de productos plásticos por sectores a nivel europeo en 2022. Adaptado de: *Plastics Europe: Plastics – the fast Facts 2023*.

I. Introducció

En este, se puede observar con claridad cómo gran parte de la producción de materiales poliméricos va destinada al sector de envase/embalaje. Esta producción alcanzó niveles cercanos a las 54,0 Mt anuales durante el año 2022, de las cuales el 39,0 % son producidas por el sector envase/embalaje, seguido por el sector de la construcción con el 23,0 % y por el de la automoción con un 8,00 %.

La elevada demanda de productos poliméricos en el sector envase/embalaje se debe, principalmente, a la ligereza y resistencia de estos, lo que permite asegurar la protección del alimento en todo momento sin aumentar la masa total del producto ya envasado, facilitando así su transporte y distribución [15]. Además, el coste de producción de los materiales poliméricos empleados para esta finalidad es muy bajo, de ahí que sean utilizados en diversas industrias tales como la médica, farmacéutica, cosmética, química, electrónica, tecnológica, etc., aunque gran parte de estos materiales van destinados al envasado en la industria alimentaria.

I.2.1. Uso de polímeros en el sector envase/embalaje de alimentos.

En la industria alimentaria, el envasado es una etapa esencial en los procesos de producción de alimentos y desempeña un papel crucial a la hora de garantizar la calidad y seguridad de estos. La funcionalidad de los envases alimentarios tradicionales se centra, principalmente, en la protección eficaz del producto ante contaminantes externos tales como microorganismos, luz ultravioleta, aire, vapor de agua, etc. que, al entrar en contacto con el alimento, pueden llegar a acelerar los procesos de descomposición y deterioro, disminuyendo su calidad [16]; [17].

Además de protección, de manera simultánea, estos tipos de envases también aportan información sobre el estado y calidad del producto [16]. Para ello, se emplean etiquetas, códigos, sellos, certificaciones e iconos que contienen información acerca de la fecha de caducidad o de consumo preferente, información nutricional, información de alérgenos, recomendaciones sobre su consumo, etc. Incluso, algunos envases utilizados

I. Introducción

para productos cárnicos, pescados y mariscos, frutas u hortalizas son transparentes, lo que permite al consumidor una visualización directa del producto, aportando información sobre su apariencia y estado.

A su vez, los envases convencionales empleados en la industria alimentaria desempeñan otras funciones además de sus propósitos principales, descritos anteriormente. En general, el hecho de envasar los alimentos facilita el transporte y distribución de estos, al igual que su almacenamiento y consumo, ayudando así a su comercialización. Además, durante los procesos de transporte y distribución, el envasado previene de posibles daños y pérdidas de producto, lo que se traduce en una reducción de las pérdidas económicas y en la preservación de la calidad y estado de los alimentos en todo momento [18].

En cuanto a materiales de envasado se refiere, dentro de la diversidad de opciones, una gran parte del mercado comercial contempla el empleo de materiales poliméricos sintéticos como poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP), polietilén tereftalato (PET), policloruro de vinilo (PVC), etc. (**Figura 4**), ya que, presentan propiedades de gran interés en el sector del embalaje tales como elevada resistencia mecánica, baja densidad, flexibilidad, fácil procesamiento y bajo coste tanto en la obtención como en el procesado [16].

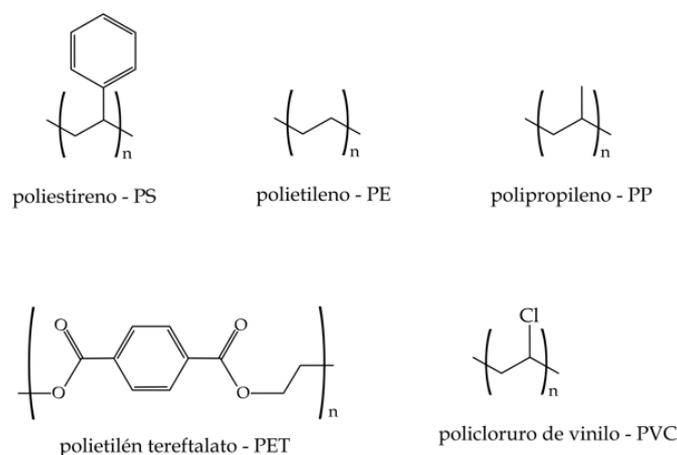


Figura 4. Formulación de la estructura química de los principales polímeros de origen petroquímico utilizados en el sector envasado/embalaje de alimentos.

I. Introducción

Debido a estas propiedades, durante las últimas décadas, la demanda de estos materiales para la fabricación de envases en la industria alimentaria ha incrementado considerablemente hasta el punto de llegar a producir cerca de 320 Mt anuales [19]. Sin embargo, gran parte de los materiales poliméricos sintéticos empleados en el embalaje de alimentos se fabrican a partir de recursos derivados del petróleo, por lo que, una vez desechados, experimentan procesos de degradación muy prolongados. Además, estos envases siguen la cultura de un solo uso, es decir, son desechados una vez consumido el alimento envasado. La combinación de ambos factores supone un importante desafío ambiental, considerando su implicación en la producción de residuos persistentes, la contaminación de ecosistemas terrestres y marinos, la filtración de sustancias químicas nocivas y su contribución en el deterioro del medio ambiente [20].

Debido a los graves riesgos que suponen los residuos plásticos generados por los envases alimentarios, en la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios e investigaciones centrados, principalmente, en el desarrollo y producción de materiales de embalaje a partir de recursos naturales sostenibles y renovables [17]. A raíz de estos estudios, se ha dado paso a la posibilidad de diseñar y fabricar materiales de embalaje biodegradables mucho más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, lo que ayudaría a reducir los impactos negativos del desecho de embalajes [18]; [19].

Con el desarrollo de la sociedad moderna, los cambios en los hábitos de los consumidores y el incremento de las preocupaciones sobre la seguridad alimentaria han transformado los métodos de envasado tradicionales, que ya no son adecuados para satisfacer la demanda actual del mercado [21]. Por esta razón, en los últimos años, muchas investigaciones se han centrado también en la mejora del rendimiento y funcionalidad de los envases utilizados en el sector alimentario [19], hasta el punto de desarrollar los denominados envases inteligentes o *smart-packaging*.

I. Introducción

I.2.2. Envasado inteligente o *smart-packaging*.

El envasado inteligente combina las funcionalidades de los envases tradicionales junto con la integración de funciones interactivas [21] que permiten monitorear la calidad de los alimentos desde su fabricación hasta su consumo, pasando por las etapas de transporte, distribución y almacenamiento. Estos sistemas de embalaje son capaces de detectar cambios en las condiciones de envasado, que pueden llegar a alterar el estado y calidad del producto, y generan señales perceptibles por fabricantes, distribuidores y consumidores en tiempo real acerca de dichos cambios. Con esto se consigue mejorar la calidad y frescura de los alimentos y, a su vez, ayuda a reducir el desperdicio de alimentos y los riesgos alimentarios [22]; [23].

De manera general, el embalaje inteligente se puede clasificar según la funcionalidad en indicadores, sensores o portadores de datos. A continuación, se describen con mayor detalle algunos ejemplos de envases inteligentes de mayor relevancia en la industria alimentaria, así como sus características y funciones.

I.2.2.1. *Indicadores en envasado inteligente.*

Los indicadores son dispositivos capaces de confirmar la presencia o ausencia de una sustancia específica o el grado de reacción entre dos o más sustancias presentes en el entorno de envasado del alimento, y aportar dicha información mediante, por ejemplo, un cambio de color. La funcionalidad de los indicadores en el embalaje alimentario se centra en la proporción de información visual al consumidor acerca de cualquier cambio en el envase o en las condiciones del entorno, tales como temperatura, pH, presencia de gases, etc., los cuales pueden llegar a deteriorar la calidad del producto envasado [21].

A nivel industrial, diversas empresas ya han desarrollado y comercializado estos sistemas de envasado para la monitorización de la calidad de los productos alimentarios. Un ejemplo de ello es el dispositivo SensorQ™ desarrollado por la empresa holandesa Royal DSM NV en colaboración con la compañía estadounidense Food Quality Sensor

I. Introducción

International o el indicador tiempo-temperatura (TTI) Vitsab L5-8 TTI Seafood label desarrollado por la empresa Vitsab International AB.



Figura 5. SensorQ™, Vitsab L5-8 TTI Seafood label.

En el caso del dispositivo SensorQ™, se trata de un indicador de frescura utilizado para la monitorización del pH para el envasado de productos cárnicos. Este indicador es capaz de mostrar mediante un cambio de color la presencia de aminas volátiles, dentro del propio envase, resultantes del proceso de degradación microbiana de la carne. De esta manera, cuando el indicador presenta un color anaranjado la presencia de aminas volátiles es insignificante, es decir, el producto está fresco. En caso contrario, si el indicador presenta un color rosado, marrón o azulado la concentración de aminas excede el nivel umbral, por lo que no se recomienda el consumo del producto envasado [24].

Los indicadores tiempo-temperatura (TTI) permiten monitorizar el historial de temperatura de envasado del producto durante su transporte, distribución y almacenamiento, siendo capaces de detectar cualquier fluctuación de temperatura que se pueda producir durante dicho tiempo [25]. El indicador Vitsab L5-8 TTI Seafood label permite detectar cualquier variación de temperatura durante el envasado del producto a través de cambios en su coloración, basados en variaciones de pH. Un color verde indica que el producto no ha sufrido ninguna fluctuación de temperatura durante el tiempo que ha permanecido envasado, por lo que es apto para el consumo. En caso contrario, cuando el indicador presenta colores anaranjados-rojizos, no se recomienda su consumo.

I. Introducció

A pesar de tratarse de sistemas de envasado aplicados y comercializados en la industria alimentaria, en los últimos años, numerosos estudios e investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevos indicadores para su posible aplicación en el envasado de alimentos. Sobhan, Abdus, *et al.* [26] desarrollaron un indicador de pH basado en nanofibras de celulosa-quitosano teñidas con síntesis de rojo de metilo y recubiertas con PLA para la monitorización del pH en productos cárnicos y pescados. Puttipan, Rinrampai, *et al.* [27] han sido los primeros en utilizar betalaínas como colorantes naturales para el desarrollo de un indicador tiempo-temperatura (TTI).

1.2.2.2. Sensores en envasado inteligente.

Dentro del campo de los envases inteligentes, los sensores están considerados como las tecnologías más avanzadas, ya que, son capaces de detectar la presencia de ciertas sustancias o analitos y convertir dicha información en energía medible. La señal convertida por el sensor puede ser óptica, química, eléctrica o térmica, y permite indicar la presencia del analito en estudio [21]. En la actualidad, en el envasado inteligente de alimentos se emplean sensores de gas, de humedad, incluso, los denominados biosensores. A nivel industrial, diversas empresas también han desarrollado y comercializado sensores para el envasado inteligente de alimentos; sin embargo, en menor proporción que los indicadores. Un ejemplo de ello es el sensor de O_2 O2xyDot desarrollado por la compañía Oxysense, el cual se muestra en la siguiente figura.



Figura 6. a) Sensores O2xyDot; b) Sistema de medición de O_2 .

I. Introducción

Se trata de un sensor óptico de O_2 formado por una matriz polimérica hidrófoba permeable a los gases donde se ha inmovilizado un compuesto fluorescente orgánico que absorbe radiación a longitudes de onda de 470 nm (azul) y emite fluorescencia sobre los 630 nm (rojo). En este caso, la medición de la concentración de O_2 se realiza a través de la desactivación fluorescente. El sensor se coloca en el interior del propio envase y se ilumina con una luz azul emitida por un LED, produciéndose la fluorescencia, lo que se traduce en la emisión de luz roja, la cual es captada por un fotodetector. La presencia de O_2 afecta directamente a la intensidad de la fluorescencia debido al fenómeno de apagamiento por colisión. Esto ocurre debido a que las moléculas de O_2 interactúan con el compuesto fluorescente, disipando parte de la energía que de otro modo sería emitida como luz roja. Este proceso reduce la intensidad de la luz fluorescente observable. Por tanto, a mayor concentración de O_2 , menor es la intensidad de la fluorescencia emitida por el sensor [28].

Otro ejemplo a nivel industrial es el caso de un biosensor desarrollado por la compañía Flex Alert, utilizado principalmente para la detección de patógenos en cereales o frutos secos. Su funcionamiento se basa en reacciones anticuerpo-antígeno, de tal manera que, en presencia de bacterias patógenas, la toxina bacteriana se une a los anticuerpos y se inmoviliza sobre una fina capa de película polimérica flexible, lo que da lugar a un cambio de color en el biosensor [28].

A pesar de tratarse de sistemas de envasado ya aplicados y comercializados en la industria alimentaria, se han publicado una gran variedad de artículos acerca del desarrollo de nuevos sensores para su posible aplicación en el envasado de alimento. Vilela, Carla, *et al.* [29] desarrollaron una película mediante la polimerización de metacrilato de sulfobetaína en el interior de una de la red nanofibrosa de nanocelulosa bacteriana, la cual presentó una elevada resistencia mecánica, resistencia a la radiación UV, propiedades antioxidantes y un gran potencial para la monitorización de humedad en alimentos.

I. Introducció

1.2.2.3. Portadores de datos en envasado inteligente.

Por último, también cabe destacar el papel de los portadores de datos en el envasado de alimentos. La función principal de estos dispositivos es la de facilitar y mejorar la eficiencia del flujo de información a lo largo de la cadena de suministro de los productos [28]. A diferencia de los indicadores y sensores, los portadores de datos no permiten monitorizar la frescura de los alimentos; sin embargo, son de gran importancia para el seguimiento y control de inventarios, prevención de robos, protección frente a falsificaciones y para la trazabilidad de los productos, lo que permite rastrear durante toda la cadena de suministro los pasos seguidos por el alimento antes de ser consumido [28]; [21].

Dentro de los portadores de datos se encuentran dispositivos como los códigos de barras o dispositivos mucho más actualizados y complejos como es el caso de los sistemas de identificación por radio frecuencia (RDIF). Con respecto a los códigos de barra existen los básicos códigos de 1D, utilizados para la codificación de datos e información del producto envasado, y los códigos de barras 2D, como los de respuesta rápida (QR), que presentan una mayor capacidad de almacenamiento, capaces de llegar a proporcionar información acerca del número de lote, detalles nutricionales o instrucciones de preparación. Además, los QR ofrecen una mayor comodidad a los consumidores, ya que, la lectura se puede realizar mediante cualquier dispositivo móvil. Con respecto a los RDIF, estos dispositivos se caracterizan por presentar un mayor almacenamiento de datos e información que los códigos de barra y por el hecho de poder transferir información a largas distancias, lo que se traduce en una mejora en la identificación y trazabilidad de productos [28]; [21].

A pesar de que los portadores de datos no están directamente relacionados con la monitorización de la frescura de los alimentos, en 2009 la compañía japonesa To-Genkyo presentó una etiqueta con una doble funcionalidad: ofrecer información acerca del producto envasado y, a la vez, actuar como un indicador de frescura.

I. Introducció



Figura 7. Etiqueta indicadora desarrollada por la compañía To-Genkyo.

Al igual que los indicadores de frescura comentados anteriormente, esta etiqueta, al detectar la presencia de aminas liberadas durante los procesos de descomposición de los alimentos, sufre un cambio de color significativo. La particularidad de este indicador es que el cambio de color indicativo del mal estado del alimento evita la lectura del código de barras, impidiendo así la venta del producto.

Tal y como se ha podido observar, los cambios de color generados por las variaciones en las condiciones de envasado de alimentos frescos tienen una gran aplicabilidad en el envasado de dichos productos, ya que, permiten monitorizar su frescura. El fenómeno que hay detrás de este comportamiento es denominado halocromía y, en el siguiente apartado, se explicarán sus principios de funcionamiento para la monitorización del pH.

I.3. Fenómenos de halocromía y monitorización del pH.

I.3.1. Halocromía.

Algunos materiales presentan la capacidad de poder cambiar de color reversiblemente en función de algunos estímulos de su entorno. Estos materiales son denominados crómicos y responden a diferentes estímulos, tales como la luz (fotocrómico), el calor (termocrómico), el pH (halocrómico), etc. [30].

En los últimos años, el concepto de halocromía ha ganado importancia en el sector embalaje/envasado destinado a alimentos frescos, ya que, las variaciones de pH pueden ser utilizadas para determinar el deterioro de alimentos [24]. Por definición, el pH es una medida del grado de acidez o alcalinidad a través de la actividad de iones de hidrógeno (H^+) en una sustancia o solución.

$$pH = -\log[H^+] \qquad \text{Ecuación 1}$$

El pH se cuantifica en una escala de 0 a 14, de tal manera que las soluciones con un valor de pH de 7 se consideran neutras. Para valores inferiores a 7, la concentración de iones de hidrógeno es mayor y la solución se considera ácida. En caso contrario, cuando el valor de pH es superior a 7, la concentración de iones hidrógeno es menor y la solución se considera alcalina.

En relación con el embalaje/envasado de alimentos, el valor del pH está ampliamente relacionado con la actividad microbiana, las enzimas endógenas y los procesos de descomposición de proteínas, los cuales dependen del tipo de alimento y de las condiciones de envasado, principalmente. Durante los procesos de descomposición de los alimentos se produce un aumento de la actividad microbiana, lo que se traduce en la liberación de ácidos orgánicos, aminos, dióxido de carbono (CO_2), ácido clorhídrico (HCl), etc., cuya presencia produce variaciones en el pH de los alimentos envasados y de

I. Introducción

su entorno. Estas variaciones de pH pueden considerarse como signos de deterioro de los alimentos e, incluso, pueden detectarse visualmente mediante la utilización de indicadores [24].

En el caso de los pescados y mariscos o carne ricas en proteínas, para determinar y controlar su calidad y frescura se emplea un parámetro denominado TVB-N (Nitrógeno Básico Volátil Total), el cual cuantifica la presencia de compuestos nitrogenados tales como la dimetilamina (DMA), la trimetilamina (TMA) y el amoníaco (NH_3). Estos compuestos nitrogenados se generan durante el proceso de descomposición del alimento, proceso donde se incrementa la actividad bacteriana, responsable de la descomposición de las proteínas en aminoácidos. Por tanto, las altas concentraciones de TVB-N pueden emplearse de manera indirecta para la monitorización del pH en pescados y carnes, ya que, la presencia de aminas volátiles supone variaciones de pH en el propio envase que pueden ser visualizadas de directamente mediante cambios de coloración en el indicador [31]; [32].

I.3.2. Compuestos con comportamiento halocrómico.

En la actualidad, existen una gran variedad de compuestos y sustancias de distinta naturaleza que presentan propiedades halocrómicas y que, por tanto, permiten indicar variaciones de pH en el entorno mediante cambios colorimétricos. En los compuestos halocrómicos los cambios de color se producen debido a la alteración en su estructura química cuando se producen variaciones de pH, lo que afecta la forma en que estos compuestos absorben y reflejan la luz, cambiando así el color percibido. En función del origen, estos se clasifican en dos categorías principales: sintéticos y naturales.

I.3.2.1. Compuestos con comportamiento halocrómico sintéticos.

Desde el punto de vista funcional, los compuestos halocrómicos sintéticos empleados para la monitorización del pH se caracterizan por presentar una gran intensidad de color, estabilidad y su bajo coste [24]. Debido a estas propiedades, los compuestos halocrómicos sintéticos se han empleado para el desarrollo de una gran

I. Introducción

variedad de envases inteligentes para productos alimentarios. Un ejemplo de ello es la utilización de azul de bromotimol para el desarrollo de un indicador de CO₂ (Lyu, Ji Sou, *et al.* [33]) o la utilización de verde de bromocresol para la fabricación de un indicador de frescura capaz de monitorear la frescura del pescado fresco (Liu, Xiuying, *et al.* [34]).

Una gran variedad de compuestos halocrómicos sintéticos, tales como el azul de bromotimol, el verde y el púrpura de bromocresol, el rojo de metilo, el rojo de clorofenol, etc., han mostrado ser seguros a la hora de ser utilizados para su aplicabilidad en el envasado inteligente de alimentos, siempre y cuando sean utilizados según indiquen las regulaciones de seguridad establecidas.

Sin embargo, a pesar de su utilización y de las propiedades que ofrecen, existe cierta preocupación sobre la toxicidad y la naturaleza cancerígena de ciertos compuestos [35], lo que ha dado lugar al estudio e investigación de posibles alternativas, siendo una de ellas, la sustitución de los compuestos sintéticos por compuestos de origen natural con comportamiento halocrómico.

1.3.2.2. Compuestos con comportamiento halocrómico naturales.

En comparación con los sintéticos, desde el punto de vista funcional, los compuestos halocrómico naturales, en general, presentan una menor intensidad de color y estabilidad a la hora de ser aplicados para el desarrollo de sistemas de envasado inteligente en alimentos. A pesar de ello, existe un gran interés por el uso de los compuestos halocrómicos naturales, el cual no solamente se centra en la no toxicidad de estos, sino también en la sostenibilidad, ya que, pueden ser obtenidos a partir de fuentes renovables, por lo que, una vez finalizada su tiempo de vida útil, el impacto ambiental es mucho menor que el generado por los compuestos sintéticos.

Los compuestos halocrómicos naturales se encuentran en una gran variedad de frutas, plantas y vegetales como es el caso de la curcumina, extraída del rizoma de la cúrcuma, la alizarina, presente en las raíces de la *Rubia tinctorum L.*, o las betalaínas, obtenidas de la planta de remolacha y pitaya. Estos compuestos ya se han utilizado para

I. Introducció

la investigació y desarrollo de nuevos sistemas de envasado inteligente en alimentos, donde cabe destacar el uso y estudio persistente de las antocianinas.

Las antocianinas son pigmentos naturales solubles en agua y principales responsables de los colores rojo, morado y azul en una gran variedad de frutas, plantas y vegetales. A diferencia de la curcumina o las betalaínas, las antocianinas presentan la capacidad de poder cambiar de color en función de las variaciones de pH, en un amplio rango. Esta propiedad es debida a modificaciones estructurales resultantes de la naturaleza anfótera de las antocianinas y ha incrementado su interés de aplicación en el desarrollo de sistemas de envasado de alimentos [24].

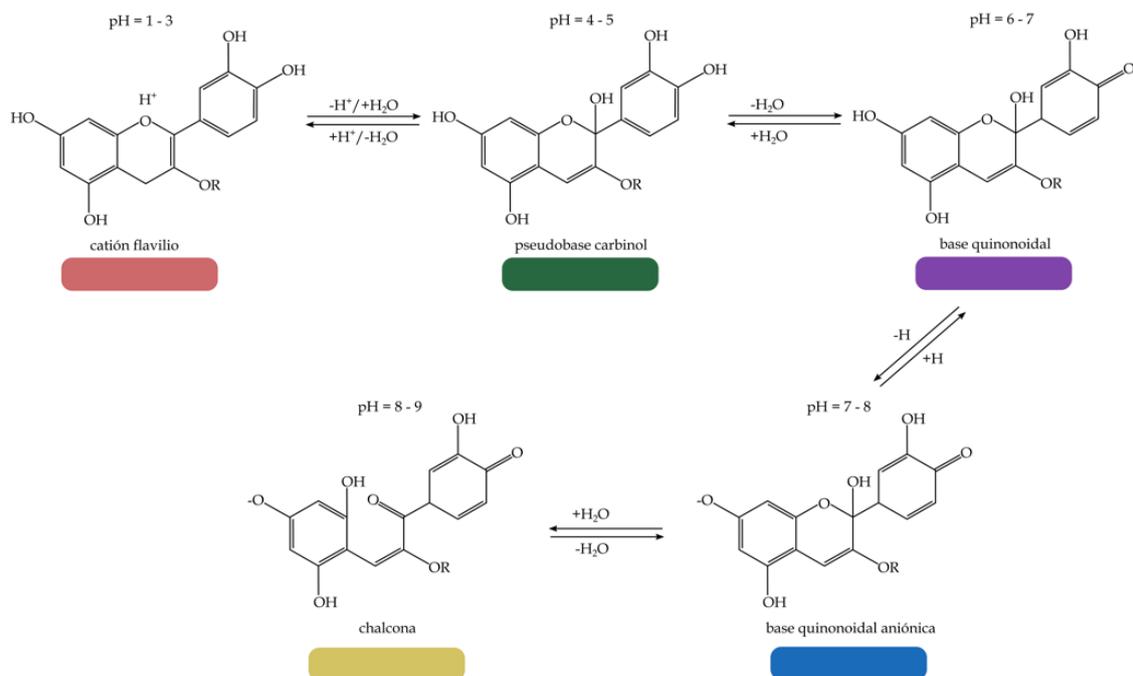


Figura 8. Transformación estructural y colorimétrica de las antocianinas en diferentes soluciones tampón. Adaptado de: [35].

En condiciones de pH muy ácidos, en las antocianinas predomina el cation flavilio, el cual exhibe un color rojo intenso. Un ligero aumento de pH hasta valores de pH entre 4 y 5 supone la rápida hidratación del cation flavilio y la aparición de especies incoloras que disminuyen la intensidad del color rojo. La desprotonación del cation

I. Introducció

flavilio da lugar a la formació de la base quinoideal de color púrpura a $\text{pH} = 7$, seguido de la formación de la base quinoideal aniónica a $\text{pH} = 8$, el cual exhibe un color azul intenso. Por último, para valores de pH superiores a 8, se produce la degradación de los grupos sustituyentes, dando lugar a la formación de chalcona de color amarillo [24].

Dentro de las antocianinas, se encuentra una amplia variedad de subgrupos específicos, como es el caso de las enocianinas. Estos colorantes naturales se encuentran predominantemente en la piel de las uvas y son cruciales para el color del vino tinto.



Figura 9. Enocianinas en forma de polvo extraídas de la piel de la uva morada. Fuente: *Europages*.

Además de en la piel de las uvas, la enocianinas se encuentran en una gran variedad de frutos como las moras y los arándanos, donde aportan tanto color como propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud.

Otro ejemplo de compuesto con propiedades halocrómicas de origen natural es el caso de la curcumina, la cual se extrae del rizoma de la cúrcuma. La curcumina presenta la capacidad de poder cambiar de color en función de las variaciones de pH , sin embargo, estos cambios de color no se producen en un rango de pH tan amplio como en el caso de las antocianinas.

I. Introducció

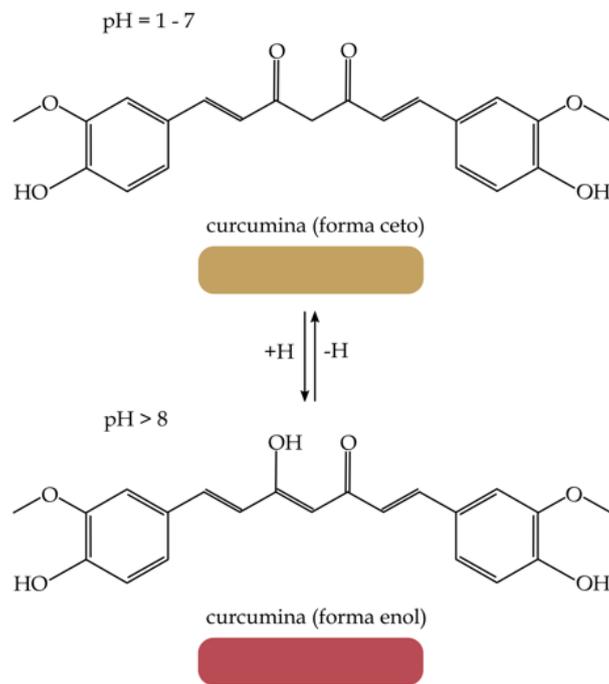


Figura 10. Transformació estructural i colorimètrica de curcumina en funció del pH. Adaptado de: [24].

En la figura anterior, se muestra la estructura química de la curcumina. Se trata de una estructura simétrica en la que persiste un equilibrio ceto-enólico de manera que, dependiendo de las condiciones del medio, predomina su forma ceto o la enólica. En valores de pH ácidos o neutro predomina la forma ceto, responsable del color amarillo. En cambio, para colores de pH superiores a 8 predomina la forma enólica, lo que provoca un cambio de color a rojo [24].

Las propiedades halocrómicas presentes en compuestos sintéticos, como el azul de bromotimol, y en compuestos naturales, como las antocianinas o la curcumina, han despertado gran interés en el desarrollo de sistemas de envasado inteligente debido a su capacidad de cambio de color en función de las variaciones de pH producidas en el entorno. De ahí, que numerosos estudios de investigación hayan optado por la utilización de este tipo de compuestos.

I. Introducción

I.4. Films poliméricos con comportamiento halocrómico.

En los últimos años, se ha incrementado el interés e investigación en el desarrollo de materiales con comportamiento halocrómico para su aplicación en el envasado inteligente de alimentos. Estos materiales se integran directamente en los envases tradicionales, siendo capaces de monitorizar las condiciones de envasado de los alimentos (pH, temperatura, presencia de gases, etc.) desde su envasado hasta su consumo, pasando por las distintas etapas de transporte, distribución y almacenaje.

Además, a partir de la detección de variaciones en las condiciones de envasado, estos materiales son capaces de proporcionar una respuesta, como un cambio de color, legible y muy fácil de interpretar por los fabricantes, proveedores y consumidores. Esta respuesta, ofrece información acerca de la calidad y frescura del alimento envasado, lo que ayuda a mejorar la seguridad alimentaria, así como a reducir el desperdicio de alimentos [36].

Paralelamente, la industria del envasado de alimentos ha experimentado un aumento significativo en el desarrollo y aplicación de films o películas poliméricas. A pesar del bajo espesor que presentan las películas poliméricas, ofrecen diversas propiedades de interés en el envasado de alimentos, tales como flexibilidad, durabilidad, y barreras efectivas contra gases y humedad. Además, con respecto a la producción de polímeros en formato film, debido a su bajo espesor y tamaño, la cantidad de material utilizada por el film es muy reducida.

La combinación de películas poliméricas con compuestos halocrómicos ha abierto nuevas posibilidades para la creación de envases inteligentes, de ahí que numerosos estudios de investigación se hayan centrado en el desarrollo de sensores halocrómicos para la monitorización de la frescura y calidad de los alimentos envasados.

Los recientes estudios se han centrado, principalmente, en la sustitución de materiales polímeros sintéticos por polímeros de origen renovable como proteínas o

I. Introducción

polisacáridos, con el fin de aumentar la sostenibilidad y reducir los impactos negativos en el medio ambiente. A su vez, debido a la preocupación por la toxicidad y peligrosidad de ciertos compuestos halocrómicos sintéticos, también se ha incrementado el interés por la utilización de pigmentos halocrómicos naturales para la fabricación de films poliméricos, con el objetivo de impedir la contaminación de los alimentos envasados, mejorando así la seguridad alimentaria [36].

Chen, Hui-zhi, *et al.* [37] desarrollaron films halocrómicos sensibles a las variaciones de pH de distinta composición mediante la adición de curcumina y antocianinas sobre una matriz de almidón, polivinil alcohol (PVA) y glicerol. Los espectros obtenidos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) mostraron una gran compatibilidad entre los compuestos halocrómicos utilizados y los sustratos formadores de las película. Además, la presencia del glicerol mejoraba el comportamiento de los films ante la solubilidad en agua y la permeabilidad al vapor de agua. Por último, para evaluar su comportamiento como posibles indicadores, cada uno de los films fueron colocados junto con 100 g de carpa durante 10 días a una temperatura constante de 4 °C. El film compuesto por almidón, PVA y glicerol y que incorporaba tanto curcuminas como antocianinas en una proporción 2:8 (v/v) fue el que mejor correlación presentó con respecto al grado de frescura del pescado.

El interés por el desarrollo de nuevos materiales halocrómicos para la monitorización de la frescura de alimentos frescos, también ha llevado a la implementación de nuevas técnicas y procesos de fabricación, tales como la utilización de microcápsulas. Liu, Yaowen, *et al.* [38] desarrollaron microcápsulas formadas a partir de colágeno y quitosano, en cuyo interior se añadieron curcuminas. Estas microcápsulas fueron aplicadas sobre películas basadas en carboximetilcelulosa (CMC), con el fin de ser empleadas para la monitorizar la frescura de la carne de cerdo. La presencia de las microcápsulas mejoró la estabilidad térmica, la barrera al vapor de agua y la resistencia a tracción de las películas, además de proporcionar propiedades antioxidantes y antibacterianas. Las propiedades halocrómicas de los films fueron evaluadas situando los sensores halocrómicos junto con 30 g de carne de cerdo durante 8 días y a una temperatura constante de 4 °C. Durante el proceso de descomposición se observó un

I. Introducción

cambio de color distintivo (amarillo > amarillo oscuro > amarillo claro), el cual fue analizado mediante el software *ColorColl* desde un dispositivo móvil, permitiendo determinar las coordenadas colorimétricas RGB (Red Green Blue) de los films.

Tal y como se ha podido observar, las películas con comportamiento halocrómico presentan un gran potencial como dispositivos para el envasado inteligente en la industria alimentaria, ya que, son capaces de monitorizar la frescura de los alimentos, mejorando la seguridad alimentaria. Además, con respecto a los materiales utilizados para su fabricación, estas películas ofrecen un gran abanico de posibilidades, aunque en los estudios más recientes se observa una mayor tendencia al estudio e investigación del desarrollo de películas poliméricas a partir de polisacáridos o proteínas, así como la utilización de compuestos naturales con propiedades halocrómicas.

I.5. Estructura y aplicaciones de la zeína en el sector envasado.

Tal y como se muestra en la **Figura 2**, los materiales poliméricos derivados de las proteínas pertenecen al grupo de materiales clasificados como biodegradables y de origen renovable. Por tanto, desde el punto de vista medioambiental, estos materiales presentan un gran potencial como posibles sustitutos de los materiales sintéticos tradicionales utilizados para la fabricación de envases.

Las proteínas son macromoléculas naturales que desempeñan un papel fundamental en una amplia variedad de procesos biológicos y son esenciales para la vida. La base estructural de estas macromoléculas está constituida por la unión de aminoácidos mediante enlaces peptídicos (**Figura 11**). El ensamblaje de un pequeño número de aminoácidos da lugar a oligopéptidos, mientras que cuando el número de aminoácidos unidos es superior a 10, se forman estructuras lineales de polipéptidos. Se denomina proteína cuando el número de aminoácidos supera los 50 [39].

I. Introducción

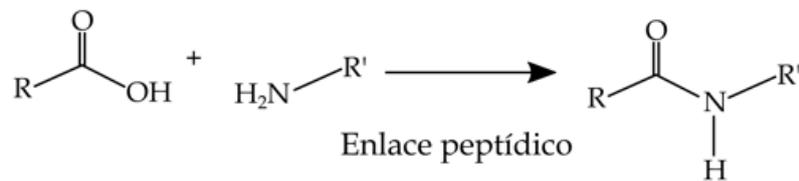


Figura 11. Formación del enlace peptídico entre aminoácidos.

Las proteínas poseen distintos niveles de organización que les otorgan estructuras sumamente complejas, las cuales se describen a continuación.

I.5.1. Niveles de organización estructural de las proteínas.

Existen un total de cuatro niveles de organización estructural de las proteínas (**Figura 12**), los cuales se dividen en: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

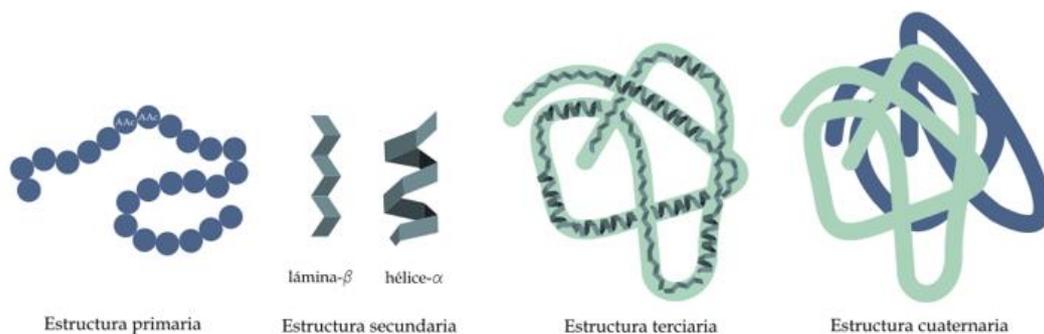


Figura 12. Representación esquemática de los niveles de organización de las estructuras proteicas o proteínas.

La estructura primaria, se corresponde con la estructura básica de formación de las proteínas, la cual está compuesta por secuencias de aminoácidos unidos entre ellos mediante enlaces peptídicos. Esta estructura viene determinada por la secuencia de aminoácidos, es decir, por el número de aminoácidos presentes y por el orden y la disposición.

I. Introducción

La estructura secundaria se forma a través de las interacciones entre diversas zonas de las cadenas, generadas por la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que componen el enlace peptídico. Estas interacciones dan lugar a distintas configuraciones como la hélice- α o la lámina- β .

La estructura terciaria está compuesta a partir de plegamientos y enrollamientos de las estructuras secundarias, los cuales son debidos a los enlaces covalentes o fuertes interacciones entre los aminoácidos correspondientes a diferentes estructuras secundarias (hélice- α , la lámina- β , etc.), dando lugar a estructuras de mayor complejidad.

En estas estructuras, se puede producir el proceso de desnaturalización, donde estas interacciones responsables de la estructura terciaria se rompen. La rotura de dichos enlaces supone la pérdida de la estructura terciaria y se dice que la proteína está desnaturalizada.

La estructura cuaternaria corresponde con el nivel superior de ordenación estructural en las proteínas y es conformada por la unión de diversas cadenas de polipéptidos con diversas estructuras terciarias mediante interacciones débiles. Es importante destacar, que no todas las proteínas llegan a presentar la estructura terciaria y, solamente algunas, como la hemoglobina, llegan a adquirir la estructura cuaternaria [39].

I.5.2. Proteína de maíz: Zeína.

La zeína es una proteína obtenida del maíz, perteneciente a la familia de las prolaminas, las cuales actúan como proteínas de reserva y almacenamiento en diversos cereales.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la estructura básica de las proteínas está compuesta por secuencias de aminoácidos. En el caso de la zeína, esta es rica en aminoácidos como la metionina y la cisteína; sin embargo, es deficiente en aminoácidos

I. Introducción

esenciales como la lisina y el triptófano, lo que limita su valor nutricional en comparación con otras proteínas alimentarias [40].

La composición y conformación de aminoácidos desempeñan un papel fundamental en la funcionalidad y propiedades de las proteínas. En el caso de la zeína, su estructura presenta un alto contenido de aminoácidos de naturaleza no polar, lo que se traduce en un comportamiento hidrófobo por parte de la zeína. A pesar de no ser soluble en agua, sí que lo es en alcoholes como el etanol, especialmente en mezclas con agua [40]; [41].

Desde el punto de vista industrial, la zeína destaca por su comportamiento termoplástico, por lo que es empleada como compuesto base para el desarrollo de materiales poliméricos. Para ello, se benefician de la solubilidad de la zeína en alcoholes para la fabricación de películas o recubrimientos de muy poco espesor, junto con plastificantes y otros aditivos [40].

A su vez, los materiales poliméricos basados en zeína presentan gran capacidad para la inmovilización de diferentes compuestos y moléculas, lo que permite retener desde enzimas y antioxidantes, hasta pigmentos y compuestos halocrómicos en su estructura, mejorando sus propiedades funcionales. Además de inmovilizar, estos materiales también presentan la capacidad de encapsulación. Los materiales poliméricos de zeína protegen eficazmente los compuestos encapsulados contra la degradación causada por factores ambientales como la luz, el oxígeno y la humedad, lo que mejora la estabilidad y prolonga la vida útil de los compuestos encapsulados.

Los materiales poliméricos en formato film desarrollados a partir de zeína presentan, además, la capacidad de poder formar barreras eficaces contra gases y humedad, crucial para la preservación y prolongación de la vida útil de los alimentos [41]. El gran contenido de aminoácidos de naturaleza no polar en su estructura reduce la permeabilidad al agua, lo que proporciona una barrera frente a la humedad. Además, la zeína permite el desarrollo de films uniformes, densos y con poca porosidad, lo que mejora la eficacia como barrera física frente a la humedad y a gases.

I. Introducción

Tal y como se muestra en la **Figura 2**, los materiales derivados de proteínas, como la zeína, son clasificados como materiales de origen renovable y biodegradables. Al ser derivados de fuentes naturales como el maíz, estos materiales contribuyen a la reducción de la dependencia de recursos fósiles no renovables y disminuyen la huella ambiental. Además, su capacidad para biodegradarse en condiciones ambientales evita la acumulación de residuos poliméricos persistentes en el medio ambiente, ayudando a mitigar problemas de contaminación. Esto los convierte en una opción atractiva como posible alternativa sostenible a los materiales poliméricos convencionales.

Por último, los materiales derivados de la zeína también se caracterizan por otras propiedades como su transparencia, tenacidad y flexibilidad, propiedades adhesivas, etc. Además, al tratarse de materiales desarrollados a partir de una proteína derivada de una fuente alimentaria, la zeína es segura en contacto directo con alimentos, incluso, existe la posibilidad de la obtención de materiales comestibles.

Esta combinación de propiedades aumenta el interés de aplicación de los polímeros derivados de la zeína, materiales de gran interés en una amplia variedad de sectores, principalmente, en el envasado de alimentos.

I.5.3. Aplicaciones de la zeína en el envasado de alimentos.

Recientemente, en numerosos estudios de investigación, la zeína ha sido utilizada como compuesto base para el desarrollo de materiales poliméricos aplicados al envasado de productos alimentarios. Este interés por parte de los investigadores se debe principalmente a la biodegradabilidad y a la capacidad de polimerización de la zeína, lo que permite la fabricación de películas con propiedades de gran atractivo en dicho sector.

Yi, Fangxuan, *et al.* [42] desarrollaron un film polimérico inteligente indicador de pH a para la monitorización de la frescura del hongo *Agaricus bisporus*. Estos films se fabricaron con base de zeína y quitosano y con la incorporación de antocianinas procedentes del rábano ojo. Debido a la capacidad de inmovilización de la zeína, las

I. Introducción

antocianinas se aplicaron con éxito sobre la película polimérica, lo que mejoró la compatibilidad entre las antocianinas y la matriz polimérica. La fuerte interacción entre las antocianinas y la película polimérica supuso una mejora en las propiedades de barrera y en la resistencia a la tracción y al agua de la propia película. Con respecto a su funcionalidad como posibles indicadores de pH, las películas presentaron cambios de color detectables a simple vista debidos a el aumento de la concentración de CO₂ durante el proceso de descomposición del hongo a temperatura ambiente, dando mejores resultados el film con un 9,00 % en peso de antocianinas.

Xavier, Leandra Oliveira, *et al.* [43] aplicaron la capacidad de encapsulamiento de la zeína para para la fabricación de nanocápsulas para la retención de aceites esenciales, las cuales fueron aplicadas sobre una película a base de quitosano. La presencia de estas nanopartículas mejoró las propiedades antibacterianas y antioxidantes de la película. Además, las nanocápsulas otorgaron una mayor protección a los aceites esenciales frente la degradación térmica. Estas películas, fueron aplicadas para el envasado de productos cárnicos, dando como resultado una mayor estabilización de las reacciones de deterioro de la carne, aumentando la vida útil del alimento.

I. Introducció

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS

II. Hipótesis y objetivos

II.1. Hipótesis de trabajo.

La creciente demanda de materiales poliméricos de origen petroquímico en el sector de envasado de productos alimentarios sigue incrementándose con el paso del tiempo. Debido a su ligereza, resistencia, durabilidad y por su bajo coste de producción, este tipo de materiales ofrecen protección ante contaminantes externos, aportan información acerca del producto envasado y facilitan los procesos de transporte, distribución, almacenaje y consumo. A pesar de ello, estos materiales siguen la cultura de un solo uso que, sumado a la producción masiva y a la mala gestión de residuos, supone un serio problema ambiental. La gran dependencia de los recursos fósiles y la baja biodegradabilidad de estos materiales contribuyen a la liberación de gases de efecto invernadero y la acumulación de residuos plásticos en los ecosistemas. Ante esta problemática, se han estudiado diversas alternativas para la sustitución de estos materiales, siendo una de las más interesantes la fabricación de materiales poliméricos derivados de proteínas.

A su vez, con el fin de satisfacer la demanda actual del mercado, se han desarrollado los envases inteligentes, como los indicadores de pH, dispositivos que permiten monitorizar la frescura de los alimentos mediante señales perceptibles a simple vista por fabricantes, distribuidores y consumidores, como por ejemplo un cambio de color. Para este propósito se emplean compuestos con comportamiento halocrómico, es decir, que presentan la propiedad de cambiar de color en función de las variaciones de pH del entorno; en el caso de los alimentos, durante los procesos de descomposición. Aunque existen compuestos halocrómicos sintéticos, recientemente, se ha estudiado la posibilidad de emplear compuestos halocrómicos naturales, debido a su no toxicidad y sostenibilidad.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la hipótesis de partida del presente trabajo establece la posibilidad de utilizar proteína de zeína junto con enocianinas, compuesto halocrómico natural derivado de la piel de la uva negra, para la fabricación de films con comportamiento halocrómico que permitan monitorizar el deterioro de los alimentos frescos envasados.

II. Hipótesis y objetivos

II.2. Objetivos.

II.2.1. Objetivo general.

El objetivo principal de este trabajo, por tanto, se centra en el desarrollo y caracterización de films halocrómicos derivados de la proteína de zeína, incorporando distintas cargas de enocianinas, para evaluar su eficiencia como indicadores de pH en la monitorización del deterioro de pescado fresco.

Este objetivo abarca tanto la fabricación y caracterización de los films halocrómicos, como su aplicación práctica en la monitorización del estado y calidad de los alimentos.

II.2.2. Objetivos particulares.

Para poder alcanzar con el objetivo principal previamente detallado se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Búsqueda bibliográfica y estudio del estado del arte.
- Desarrollo y optimización de las formulaciones de films de zeína plastificada con glicerol y de las condiciones de procesado.
- Estudio y caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.
- Preparación y desarrollo de films halocrómicos derivados de proteína de zeína con distintas cargas de enocianinas.
- Estudio de las propiedades mecánicas, térmicas, morfológicas y superficiales de los films halocrómicos mediante la aplicación de distintas técnicas de caracterización.

II. Hipótesis y objetivos

- Validación de sensores de zeína con enocianinas en condiciones *in vitro* e *in vivo* para la identificación de deterioro en alimentos frescos.
- Estudio de la biodegradabilidad de los films halocrómicos.
- Análisis de los resultados obtenidos.

II.3. Metodología y planificación.

Con el fin de alcanzar los objetivos previamente planteados se han planificado una serie de fases a desarrollar durante el presente trabajo, las cuales se detallan a continuación:

FASE 1. Búsqueda bibliográfica y estudio del estado del arte.

La fase inicial del presente trabajo se enfoca en una búsqueda exhaustiva y revisión de la bibliografía más actualizada en el área de investigación del proyecto con el objetivo de plantar las bases fundamentales. Para ello, se ha empleado la herramienta *Web of Science*, que ofrece una extensa base de datos de investigaciones y artículos científicos cuya información ha servido de gran utilidad para la realización del presente trabajo.

FASE 2. Desarrollo y optimización de las formulaciones de films halocrómicos de zeína plastificada con glicerol y de las condiciones de procesado.

A partir de la información obtenida después de la búsqueda bibliográfica, antes de iniciar el procedimiento experimental del proyecto, se han determinado las composiciones óptimas de zeína, enocianinas, glicerol ($C_3H_8O_3$) y etanol (C_2H_6O) utilizadas para el desarrollo de los films y las condiciones de procesado.

Actividad 2.1. Pruebas preliminares de *cast film*.

Se han llevado a cabo distintas pruebas preliminares con el objetivo de determinar la viabilidad y efectividad de la investigación. En estas se han desarrollado films poliméricos con distintas composiciones de zeína, enocianinas, glicerol ($C_3H_8O_3$) y

II. Hipótesis y objetivos

etanol (C_2H_6O) mediante el método de *cast film*, lo que ha permitido establecer las composiciones de los distintos componentes utilizados, así como, las condiciones de procesado que más se adecuan al contexto específico del estudio.

Actividad 2.2. Optimización de las condiciones de secado.

A su vez, estas pruebas preliminares han permitido establecer la temperatura y tiempo óptimos de secado, parámetros clave y que deben ser controlados en todo momento durante esta última etapa del proceso de fabricación de los films.

Las pruebas preliminares han resultado muy útiles y han facilitado el proceso de desarrollo de los films. De no ser por ellas, cualquier error cometido durante el procedimiento experimental realizado hubiese supuesto un retroceso significativo en el proyecto, afectando tanto tiempo como los recursos destinados al mismo.

FASE 3. Estudio y caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.

Antes de iniciar el procesado de los films, se realiza un estudio y caracterización con el fin de evaluar el comportamiento halocrómico de las enocianinas y su validez como indicador de pH.

Actividad 3.1. Preparación de las disoluciones de referencia a pH entre 2-13.

En primer lugar, prepararán 12 disoluciones tampón de pH de 10 mL a las que se les añadirán 0,1 mL de una disolución de 0,5 g/L de enocianinas. Se irá variando el pH desde 2 hasta 13 mediante la adición progresiva de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). Para poder evaluar el cambio de color, se obtendrán disoluciones de 10 mL para cada valor de pH.

Actividad 3.2. Evaluación del espectro UV-Vis de las disoluciones patrón a diferentes pH.

Una vez preparadas las distintas disoluciones patrón, se obtendrá el espectro UV-Vis de cada una de ellas mediante un espectrofotómetro, cuantificando el cambio de color producido en función del pH.

II. Hipótesis y objetivos

Actividad 3.3. Caracterización óptica del efecto halocrómico en función del pH.

Además, también se realizará una caracterización óptica del efecto halocrómico de las enocianinas en función de las variaciones de pH.

FASE 4. Preparación y desarrollo de films con cargas de enocianinas para sensores de pH.

En esta etapa se procederá a la fabricación de los films a partir de proteína de zeína y distintas cargas de enocianinas, empleando glicerol ($C_3H_8O_3$) y etanol (C_2H_6O) como plastificante y disolvente, respectivamente. Para ello, se preparará una disolución con dichos componentes y, seguidamente, la mezcla será sometida a un proceso de secado.

Tanto las composiciones de los distintos compuestos utilizados como las condiciones del procesado y de la etapa de secado han sido determinadas mediante las pruebas preliminares previamente realizadas.

FASE 5. Caracterización de los films de zeína con comportamiento halocrómico.

Una vez obtenidos los films con comportamiento halocrómico, estos serán sometidos a distintas técnicas y ensayos de caracterización con el fin de determinar sus propiedades mecánicas, térmicas, morfológicas, superficiales, etc. Para cada uno de los films procesados se realizarán los ensayos que se muestran a continuación:

Actividad 5.1. Caracterización mecánica.

La caracterización mecánica consta de la realización del ensayo de tracción.

Actividad 5.2. Caracterización térmica.

Las propiedades térmicas se obtendrán mediante calorimetría diferencia de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

Actividad 5.3. Caracterización morfológica.

II. Hipótesis y objetivos

La caracterización morfológica se realizará mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Actividad 5.4. Caracterización superficial.

Las propiedades superficiales se determinarán mediante los ensayos de colorimetría, transparencia UV-Vis, fotografía óptica, espesor i goniometría óptica.

Actividad 5.5. Otras técnicas de caracterización.

Además, también se llevarán a cabo ensayos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y un estudio del contenido de humedad de los films y de su capacidad de solubilidad en agua.

FASE 6. Validación de los indicadores halocrómicos para la identificación de deterioro en alimentos frescos.

Con el fin de evaluar y validar la eficiencia del films halocrómicos como sensores de pH para el deterioro de alimentos frescos se llevarán a cabo los siguiente ensayos:

Actividad 6.1. Validación de sensores de zeína con enocianinas en condiciones *in vitro*.

En este caso, se evaluará el cambio de color que presentan los films halocrómicos al ser sometidos a las aminas volátiles generadas por una disolución de amoníaco (NH_3) y agua destilada. El cambio de color será analizado mediante colorimetría.

Actividad 6.2. Validación de sensores de zeína con enocianinas en condiciones *in vivo*.

En cambio, en esta segunda validación, se evaluará el cambio de color de los films al ser sometidos a las aminas volátiles correspondientes al proceso de descomposición de pescado fresco. Al igual que en el caso anterior, el cambio de color también será analizado mediante colorimetría.

FASE 7. Estudio de la biodegradación de indicadores de zeína con enocianinas.

II. Hipótesis y objetivos

Con el fin de determinar la biodegradabilidad de los films halocrómicos, estos serán sometidos a un ambiente controlado de compostaje en el laboratorio durante un tiempo determinado.

FASE 8. Análisis de los resultados obtenidos y conclusiones.

Una vez realizados todos los ensayos de caracterización, se llevará a cabo un análisis de los resultados más relevantes. Para ello, se utilizarán tablas, gráficos y figuras que facilitarán su estudio, análisis y comprensión, así como un tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.

Finalmente, se establecerán una serie de conclusiones donde se analizarán los pros y contras más relevantes, además de posibles líneas futuras que permitan ampliar o mejorar los procedimientos seguidos durante el presente trabajo.

A modo de resumen, en la **Figura 13** se muestra un esquema gráfico donde se representan los objetivos planteados anteriormente junto con las distintas fases a llevar a cabo durante el presente trabajo, donde se incluyen las técnicas empleadas para el desarrollo y fabricación de los films halocrómicos y su posterior caracterización.

II. Hipótesis y objetivos

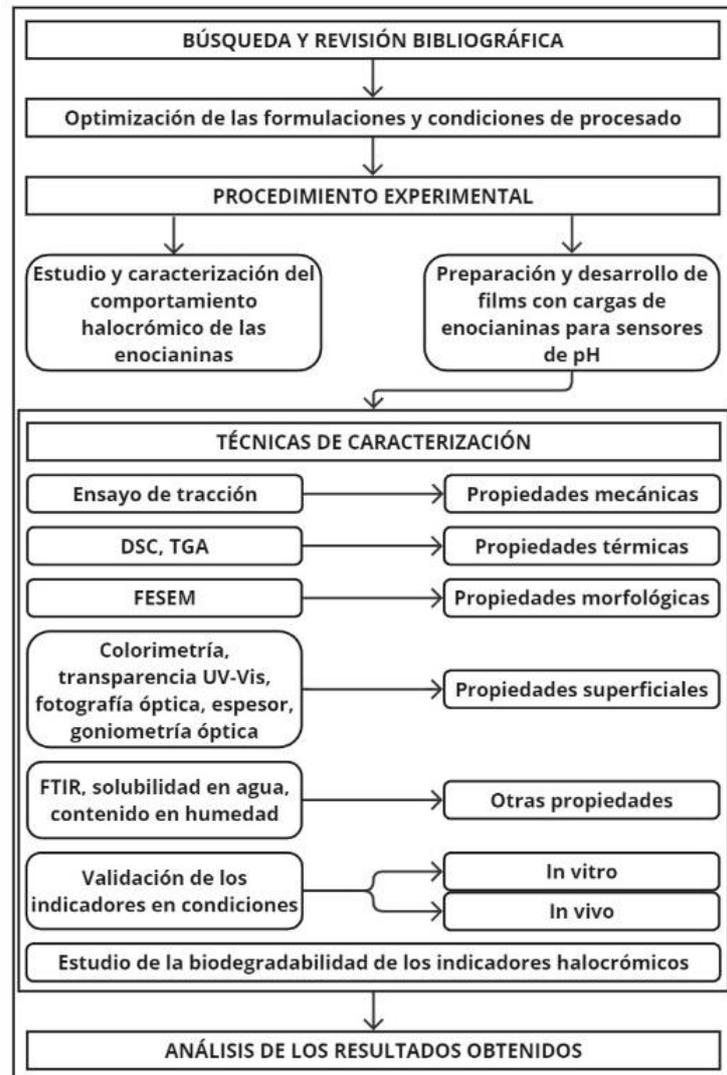


Figura 13. Esquema gráfico de planificación.

III. EXPERIMENTAL

EXPERIMENTAL

III. Experimental

III.1. Materiales.

La zeína utilizada para la fabricación de las películas poliméricas ha sido adquirida de Sigma-Aldrich (Madrid, España) en forma de polvo amarillo. Las enocianinas utilizadas como compuesto halocrómico se han extraído de la piel de las uvas tintas y han sido adquiridas de Flavorix Aromáticos SA en forma de polvo morado. También se han empleado distintos reactivos de grado técnico y de elevada pureza, tales como glicerol ($C_3H_8O_3$), etanol (C_2H_6O), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH) y amoníaco (NH_3), adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y empleados tanto para el desarrollo de las películas como en su caracterización.

III.2. Caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.

Se prepararon 12 frascos de vidrio en los cuales se introdujeron 10 mL de una disolución tampón de pH. Paralelamente, se preparó una disolución de colorante natural con una concentración de enocianinas de 0,5 g/L y se añadieron 0,1 mL de dicha disolución a las 12 disoluciones tampón de pH.

Mediante la adición progresiva de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) se obtuvieron un total de 12 disoluciones de 10 mL con valores de pH comprendidos entre 2 y 13. Las medidas de pH se realizaron mediante el pHmetro de sobremesa 50 XS de VioLab.

Posteriormente, se llevó a cabo una caracterización óptica del comportamiento halocrómico de las enocianinas y se determinaron los espectros de las disoluciones obtenidas mediante el espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 de Agilent Technologies en un rango de longitud de onda de 380 nm a 780 nm, con el objetivo de validar su aplicación como indicador de pH.

III. Experimental

III.3. Proceso de fabricación.

La preparación de las películas poliméricas derivadas de la proteína de zeína se llevó a cabo mediante el método de *cast film*. En primer lugar, se preparó la disolución formadora de la película basada en proteína de zeína. Para ello, en 70 mL de una disolución de etanol/agua al 90 % v/v se disuelven 2,5 g de proteína de zeína y un 20 % de glicerol ($C_3H_8O_3$) en peso con respecto a la proteína de zeína utilizada. En el caso de las películas con cargas de enocianinas, el proceso de preparación es el mismo, pero con la incorporación de enocianinas (1,5; 3; 4,5 y 6 % en peso con respecto a la proteína de zeína utilizada). En la **Tabla 1** se muestran las composiciones utilizadas para la preparación de las películas, así como la nomenclatura empleada a lo largo del trabajo.

Tabla 1. Composición y nomenclatura de las películas de proteína de zeína con diferentes cargas de enocianinas.

Nomenclatura	Composición			
	Proteína de zeína (g)	Glicerol (g)	Disolución agua-etanol (g)	Eno (% en peso de zeína)
Zeína	2,50	0,500	47,5	0,00
Zeína_1,5eno	2,50	0,500	47,5	1,50
Zeína_3eno	2,50	0,500	47,5	3,00
Zeína_4,5eno	2,50	0,500	47,5	4,50
Zeína_6eno	2,50	0,500	47,5	6,00

Una vez preparadas las mezclas, estas fueron sometidas a agitación magnética durante 30 min hasta obtener una disolución homogénea. Las disoluciones resultantes se calentaron a 70 °C y se mantuvieron en agitación durante 10 min, produciéndose el proceso de desnaturalización. Seguidamente, para la obtención de cada film, se vertieron 9 g de disolución en una placa Petri de poliestireno y se secaron en una estufa a 55 °C durante un tiempo comprendido entre los 60 – 80 min. Durante el proceso de secado, se produce la evaporación de la mezcla etanol/agua utilizada como disolvente, por lo que es importante mantener controlado en todo momento el tiempo y la temperatura para

III. Experimental

evitar un secado excesivo del film. Finalmente, después del proceso de secado, se separaron cuidadosamente los films de la placa Petri. Por cada composición, se han obtenido un total de cinco películas de forma circular y del tamaño de la placa Petri, las cuales fueron introducidas en un desecador a temperatura ambiente y una humedad del 58,0% para su acondicionamiento antes de realizar los ensayos de caracterización.

III.4. Técnicas y ensayos de caracterización.

Una vez desarrollados los films con comportamiento halocrómico, se llevó a cabo su caracterización. En este apartado, se describen las condiciones y procedimientos aplicados en cada una de las técnicas y ensayos de caracterización.

III.4.1. Caracterización mecánica.

III.4.1.1. Ensayo de tracción.

Los ensayos de tracción se han llevado a cabo según la norma UNE-EN ISO 527-3:2019 y el método propuesto por Rojas-Lema, Sandra, *et al.* [44], con modificaciones menores. Para la realización de los ensayos de tracción se empleó una máquina universal de ensayos Ibertest DUOTRAC-10/1200 con una célula de carga de 100 N.



Figura 14. Equipo de tracción Ibertest DUOTRAC-10/1200.

III. Experimental

Se prepararon cinco probetas de $30 \times 4 \text{ mm}^2$ por cada una de las películas obtenidas; estas se colocaron entre las mordazas con una distancia de agarre inicial de 15 mm. Cada ensayo se ha realizado a temperatura ambiente y aplicando una velocidad de 5 mm/min. Los resultados del ensayo de tracción se obtuvieron a partir del promedio de los cinco ensayos realizados por cada película.

III.4.2. Caracterización térmica.

III.4.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) 25 de TA Instruments (**Figura 15**), y se llevaron a cabo según las normas: UNE-EN ISO 11357-1:2023, UNE-EN ISO 11357-2:2021, UNE-EN ISO 11318-3:2016, UNE-EN ISO 11357-4:2021, UNE-EN ISO 11357-5:2015, UNE-EN ISO 11357-6:2018, UNE-EN ISO 11357-7:2022 y UNE-EN ISO 11357-8:2021.



Figura 15. Equipo DSC 25 de TA Instruments.

Para la realización de los ensayos, se prepararon 3 muestras por cada película con una masa comprendida entre 5 y 10 mg. Estas muestras se introdujeron en crisoles de aluminio de ultra alta pureza. En este caso, el ensayo constó de una primera etapa de calentamiento de 30 a 120 °C seguido de un enfriamiento hasta -80 °C y, finalmente, se realizó un segundo calentamiento de -80 °C hasta los 130 °C. Dichas etapas se

III. Experimental

programaron empleando una rampa de temperatura de 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno.

III.4.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA).

Los análisis termogravimétricos (TGA) se realizaron en el equipo TGA 2 SF (Figura 16) de MettlerToledo, y se llevaron a cabo según la norma UNE-ISO 247-2:2022.



Figura 16. Equipo TGA 2 SF de Mettler Toledo.

Para la realización de los análisis termogravimétricos (TGA) se han preparado tres muestras por cada película con una masa en torno a 10 mg, y se introdujeron en crisoles de alúmina. En el análisis termogravimétrico (TGA) las muestras se sometieron a un calentamiento de 30 a 700 °C aplicando una rampa de temperatura de 20 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno. El ensayo se realizó por triplicado para obtener resultados reproducibles.

III.4.3. Caracterización morfológica.

III.4.3.1. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Se evaluó la morfología de la superficie de fractura de las películas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) utilizando el equipo

III. Experimental

ZEISS ULTRA 55 FESEM (**Figura 17**) suministrada por Oxford Instruments, aplicando un voltaje de aceleración de 2kV.



Figura 17. Equipo ZEISS ULTRA 55 FESEM de Oxford Instruments.

Antes de realizar el ensayo, al tratarse de materiales poliméricos no conductores, las superficies de fractura a analizar se sometieron a un proceso de recubrimiento metálico empleando un equipo de recubrimiento o *sputtering* SC7620 suministrado por Quorum Technologies Ltd.

III.4.4. Caracterización superficial.

III.4.4.1. Fotografía óptica.

Se obtuvieron fotografías ópticas en el espectro visible con un fondo de contraste de cada una de las películas obtenidas con el objetivo de estudiar los aspectos macroscópicos y las variaciones en las tonalidades de color en función de la proporción de enocianinas empleada. Dichas fotografías, se realizaron con un dispositivo móvil, el cual ha sido colocado sobre un soporte para obtener todas las fotografías desde una misma altura.

III. Experimental

III.4.4.2. Colorimetría.

Se ha realizado un estudio colorimétrico de los films halocrómicos obtenidos mediante el espectrofotómetro de medición de color o colorímetro A Konica CM3600d Colorflex-DIFF2 (Figura 18), suministrado por Hunter Associates Laboratory, Inc, y siguiendo la norma UNE-EN ISO/CIE 11664-4:2020.



Figura 18. Colorímetro A Konica CM3600d Colorflex-DIFF2 de Hunter Associates Laboratory, Inc.

Para ello, se empleó el espacio de color CIELab donde L^* se emplea para medir el grado de luminosidad, a^* para medir el grado de verde ($a^* < 0$) o rojo ($a^* > 0$) y b^* para medir el grado de azul ($b^* < 0$) o amarillo ($b^* > 0$). Por cada película, se obtuvieron un total de cinco medidas en distintas zonas aleatorias de la superficie y se calcularon los valores promedio.

También se determinó la diferencia de color total (ΔE) de las películas en función de las concentraciones de enocianinas utilizadas para su fabricación. Para ello, se empleó la siguiente expresión:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo, en este caso, L_0^* , a_0^* y b_0^* las coordenadas colorimétricas correspondientes a la película Zeína y L^* , a^* y b^* las coordenadas colorimétricas pertenecientes a cada una de las películas con presencia de enocianinas.

III. Experimental

III.4.4.3. *Transparencia UV-Vis y espesor.*

La transparencia de las películas halocrómicas se obtuvo a partir de la transmitancia y el espesor de cada película. Las mediciones del % de transmitancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 de (Figura 19) Agilent Technologies, el cual cuenta con un soporte que permite la colocación de las muestras en formato film.



Figura 19. Espectrofotómetro UV-Visible Cary 100 de Agilent Technologies.

En este caso, se empleó una probeta por cada una de las películas en forma de semicírculo y con un tamaño suficiente como para captar en su totalidad la radiación emitida por el equipo. Se realizaron un total de tres mediciones del % de transmitancia a 600 nm por cada película y se calculó el promedio.

Con respecto al espesor, para realizar las medidas se empleó un micrómetro de Kalkum Ezquerra (Figura 20) con una sensibilidad de $\pm 0,001$ mm, realizando un total de cinco medidas en distintos puntos de la superficie de cada película, determinando el valor promedio.



Figura 20. Micrómetro de Kalkum Ezquerra.

III. Experimental

Para el cálculo del % de transparencia, se empleó la siguiente expresión:

$$\text{Transparencia (\%)} = \frac{\log T_{600}}{x} \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo T_{600} el % de transmitancia de la película a una longitud de onda de 600 nm y x el espesor de la película expresado en mm.

III.4.4.4. Goniometría óptica.

Se determinó la humectabilidad superficial a través de la medición del ángulo de contacto (θ) estático con agua, para cada una de las películas mediante goniometría óptica, empleando el método de gota sésil. Para ello se empleó un goniómetro óptico EasyDrop Standard FM140 (**Figura 21**) fabricado por KRÜSS, el cual está equipado con el software *Drop Shape Analyzer* y un sistema de captura de fotografía/video con luz estroboscópica.

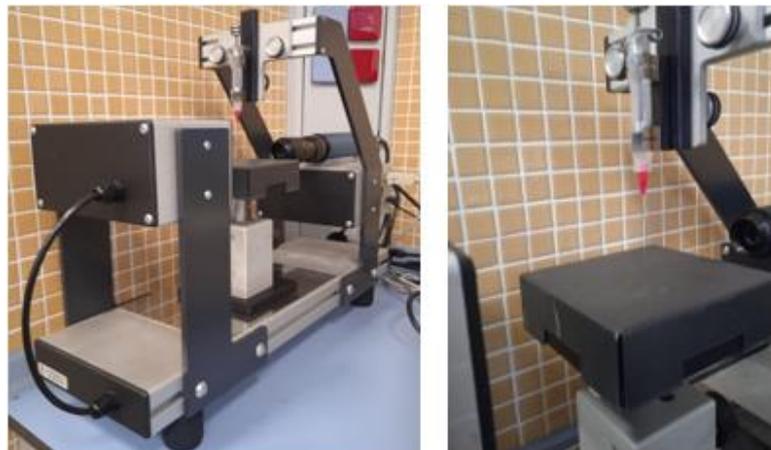


Figura 21. Goniómetro óptico EasyDrop Standard FM140.

Los ensayos se realizaron según la norma UNE-EN 828:2013. Para el procedimiento de medición del ángulo de contacto, se depositó, mediante una micro

III. Experimental

jeringa, una gota de líquido de contacto, en este caso agua destilada, sobre la superficie de cada película, obteniendo un mínimo de diez mediciones del ángulo de contacto y los valores promedio correspondientes.

III.4.5. Otras técnicas de caracterización.

III.4.5.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Para cuantificar las interacciones entre los diferentes componentes de las formulaciones, se empleó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se obtuvieron los espectros FTIR para cada una de las películas mediante el espectrómetro FTIR Spectrum Two (**Figura 22**) de Perkin Elmer y los ensayos se realizaron según la norma ISO 10640:2011.



Figura 22. Espectrómetro FTIR Spectrum Two de Perkin Elmer.

Cada uno de los espectros, se obtuvo para un rango de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} y con una resolución de 4 cm^{-1} , realizando un total de 10 escaneos. Antes de realizar el ensayo, se realizó un ensayo en blanco o *background*, con el fin de eliminar las interferencias del ambiente durante la medición, en el que se aplicaron las mismas condiciones descritas.

III. Experimental

III.4.5.2. Contenido en humedad.

El contenido en humedad de las películas se determinó según el método propuesto por Rojas-Lema, Sandra, *et al.* [44], con alguna modificación menor. Se prepararon muestras cuadradas de dimensiones de $10 \times 10 \text{ mm}^2$ por cada película, las cuales fueron pesadas antes y después de introducirlas en una estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h.

El contenido en humedad de cada una de las películas se calculó a partir de la pérdida de peso de las muestras antes y después del secado, empleando la siguiente expresión:

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{w_i - w_f}{w_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Siendo w_i el peso inicial de la muestra y w_f el peso de la muestra posterior al secado, ambos expresados en mg.

III.4.5.3. Solubilidad en agua.

La solubilidad en agua de las películas se determinó según el método propuesto por Rojas-Lema, Sandra, *et al.* [44], con alguna modificación menor. En primer lugar, se preparó una muestra cuadrada de dimensiones de $10 \times 10 \text{ mm}^2$ por cada película, y se sometieron a un proceso de secado en la estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Seguidamente, se pesaron cada una de las muestras en seco y se introdujeron en 10 mL de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Transcurrido dicho período, la fracción de muestra no solubilizada se extrajo y se sometió a un segundo proceso de secado a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h adicionales, siendo posteriormente pesada.

El % de solubilidad en agua de cada película se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left(\frac{w_i - w_f}{w_i} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

III. Experimental

Siendo w_i el peso inicial de la muestra y w_f el peso de la muestra posterior al segundo proceso de secado, ambos expresados en mg.

III.4.6. Validación de los indicadores halocrómicos.

III.4.6.1. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones *in vitro*.

Para la validación de los indicadores halocrómicos en condiciones *in vitro*, se prepararon una muestra de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ de las cinco películas desarrolladas. A su vez se preparó una disolución de amoníaco (NH_3) 0,8 M con un % v/v del 32 % de amoníaco (NH_3). Los vapores liberados por la disolución simulan las aminas liberadas durante el proceso de descomposición del pescado, lo que produce variaciones de pH, y ello se traduce en cambios de color en las películas halocrómicas.

Cada una de las muestras se colocó en la parte interna de la tapa de un recipiente de cristal sobre un fondo blanco, tal y como se muestra en la **Figura 23**. Se empleó un fondo blanco, ya que, la parte interna de la tapa presenta un color amarillo que puede llegar a alterar los resultados colorimétricos del ensayo. Posteriormente, se añadieron entre 40 y 50 mL de la disolución en el recipiente de cristal, con el fin de mantener la misma distancia entre la película y la disolución en todos los ensayos realizados.

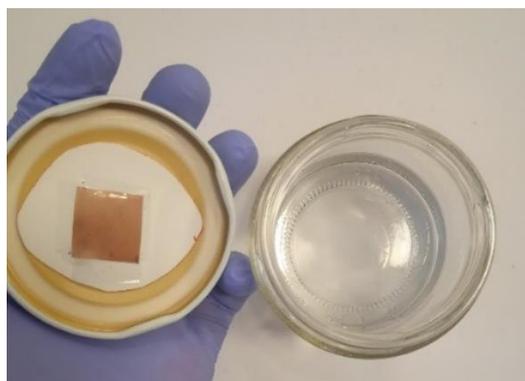


Figura 23. Colocación de las películas halocrómicas durante el ensayo de validación en condiciones *in vitro*.

III. Experimental

El procedimiento para la obtención de las coordenadas colorimétricas se describe a continuación. Inicialmente, se cierra el recipiente de cristal con la tapa, y se obtienen imágenes y las coordenadas colorimétricas CIELab de las películas cada 2 min durante 20 min y medidas adicionales a los 30, 40, 50 y 60 min. Las medidas colorimétricas se realizaron por triplicado para cada uno de los tiempos de medida y se obtuvo el valor promedio. Además, se determinó la diferencia de color total (ΔE) de cada película mediante la **Ecuación 2**, siendo, en este caso, L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 las coordenadas colorimétricas obtenidas en el tiempo 0 y L^* , a^* y b^* las coordenadas colorimétricas obtenidas en el momento del muestreo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente y se empleó la muestra de la película sin enocianinas (zeína + glicerol) como muestra de control.

III.4.6.2. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones in vivo.

En este caso, se siguió el mismo procedimiento que en los ensayos de validación en condiciones *in vitro*, pero, en este caso, empleando pescado fresco y alargando los tiempos de muestreo. Durante el proceso de degradación del pescado fresco se liberan aminos que, a medida que transcurre el tiempo, provocan un cambio en el pH del entorno, que se identifica por un cambio de color en el sensor halocrómico localizado en las tapas de los recipientes de cristal.

Se emplearon muestras cuadradas de $2 \times 2 \text{ cm}^2$ de las cinco películas desarrolladas más una muestra de control de la película Zeína_6eno. Las cinco muestras se colocaron en la parte interna de la tapa del recipiente sobre un fondo de contraste blanco y se introdujeron 30 g de pescado fresco (**Figura 24**). En cambio, en el caso de la muestra de control se realizó el mismo procedimiento, pero introduciendo entre 40 y 50 mL de agua destilada en el recipiente de cristal.

III. Experimental

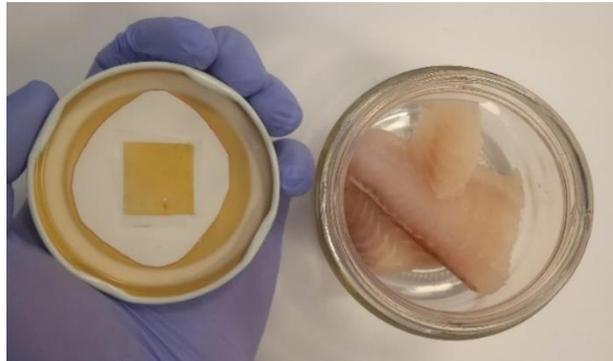


Figura 24. Colocación de las películas halocrómicas durante el ensayo de validación en condiciones *in vivo*.

El procedimiento empleado para la determinación de los cambios en las coordenadas colorimétricas derivados del cambio del pH del entorno, resultado de la degradación del pescado, se describe a continuación. Inicialmente, se cierra el recipiente de cristal con la tapa, y se obtienen imágenes y las coordenadas colorimétricas CIELab de las películas durante los días 0, 1, 4, 6 y 8. Las medidas colorimétricas se obtuvieron por triplicado para cada uno de los tiempos de medida y se calculó el valor promedio. Además, también se determinó la diferencia de color total (ΔE) de cada película mediante la **Ecuación 2**, siendo, en este caso, L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 las coordenadas colorimétricas del día 0 y L^* , a^* y b^* las coordenadas colorimétricas de los días posteriores.

Cabe destacar que la validación en condiciones *in vivo* se realizó a temperatura ambiente. Debido al desprendimiento de aminos durante la descomposición del pescado, esta caracterización se llevó a cabo en una campana extractora, ya que a partir del día 4, los olores derivados de la descomposición del pescado son muy intensos

III.4.7. Estudio de la biodegradabilidad de los indicadores halocrómicos.

Finalmente, se determinó la capacidad de biodegradación de cada uno de los films bajo condiciones de compostaje simuladas en el laboratorio, según los criterios estipulados en la normativa UNE-EN ISO 20200, con alguna modificación menor.

III. Experimental

Primeramente, se prepararon un total de ocho muestras por cada uno de los films con unas dimensiones de $2,5 \times 2,5 \text{ cm}^2$, las cuales fueron pesadas y, posteriormente, colocadas en el interior de una rejilla de material polimérico, tal y como se muestra en la siguiente figura.



Figura 25. Preparación de las muestras para la realización de los ensayos de biodegradación.

Seguidamente, se preparó el compost en un recipiente hermético con las siguientes medidas: $30 \times 20 \times 10 \text{ cm}^3$ (largo, ancho, alto). En la **Tabla 2**, se muestra la composición de los componentes utilizados para la preparación del compost.

Tabla 2. Compuestos y composiciones utilizadas en la preparación del compost para el ensayo de biodegradación.

Compuesto	Masa utilizada (g)
Agua	660
Serrín	216
Alimento para conejos	162
Compost maduro	54,0
Almidón de maíz	54,0
Sacarosa	27,0
Aceite de maíz	21,6
Urea	5,40
Total	1200

III. Experimental

Una vez preparados los 1200 g de compost, se introdujeron en el recipiente hermético junto con las muestras, de tal manera que estas quedasen totalmente cubiertas por el compost.

Para facilitar la comprensión del procedimiento seguido durante el ensayo de tracción, en la **Tabla 3**, se muestran las tareas a realizar por cada uno de los días de duración del ensayo.

Tabla 3. Procedimiento y tareas a realizar durante los días de duración del ensayo de biodegradación.

Duración desde el inicio del ensayo (días)	Tareas a realizar
0	Registrar la masa inicial del reactor
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Pesar el reactor y añadir agua hasta restituir la masa inicial. Mezclar la materia de compostaje
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Pesar el reactor y añadir agua hasta restituir la masa inicial. No mezclar la materia de compostaje
30, 45	Pesar el reactor y añadir agua hasta restituir el 80 % de la masa inicial. Mezclar la materia de compostaje
Entre 30 y 60, dos veces por semana	Pesar el reactor y añadir agua hasta restituir el 80 % de la masa inicial. Mezclar la materia de compostaje
60 y en adelante, dos veces por semana	Pesar el reactor y añadir agua hasta restituir el 70 % de la masa inicial. Mezclar la materia de compostaje

Durante la duración del ensayo de biodegradación, el reactor se mantuvo en una estufa a 58 °C con el fin de facilitar el desarrollo de microorganismos. Solamente se extrajo de la estufa para realizar las tareas mostradas en la tabla anterior y, una vez finalizada, se volvió a introducir en esta.

Con respecto a la extracción de las muestras, se extrajo una muestra de cada una de las películas en los días 7, 14, 21 y 28. Una vez extraídas, estas se limpiaron cuidadosamente con agua destilada y se sometieron a un proceso de secado a 55 °C durante 24 h.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. Resultados y discusión

En este apartado se muestran los resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental, incluyendo la caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas, la obtención de los films halocrómicos, su posterior caracterización mecánica, térmica, morfológica y superficial, la validación de los films como indicadores de pH en condiciones *in vitro* e *in vivo* y el estudio de la biodegradabilidad de los films.

IV.1. Caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.

En este apartado se describe el comportamiento halocrómico de las enocianinas a diferentes valores de pH comprendidos entre 2 y 13 para establecer su aplicación como indicadores de pH. En la **Figura 26** se muestran una imagen con las disoluciones resultantes de la caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas.

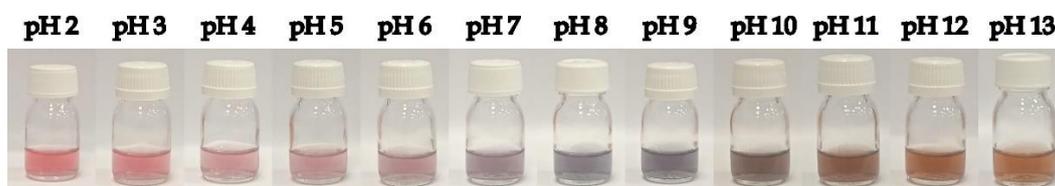


Figura 26. Caracterización óptica del comportamiento halocrómico de las enocianinas para valores de pH de 2 a 13.

Estos cambios de color se deben a las transformaciones estructurales de las enocianinas como consecuencia de las variaciones de pH (**Figura 8**). Tal y como se puede observar, para valores de pH ácidos (2-3) se aprecia un color rosado intenso debido a la predominancia del catión flavilio. El aumento de pH hasta valores de 4-5 supone la rápida hidratación del catión flavilio, y la aparición de especies incoloras que disminuyen la intensidad del color rosado. Para valores de pH neutro (6-7), debido a la formación de la base quinoidal, se distingue una tonalidad púrpura que se va

IV. Resultados y discusión

intensificando hasta alcanzar un color azul a pH 8-9 debido a la formación de la base quinoidal aniónica. Por último, para valores de pH alcalinos, se observan tonalidades marrones-anaranjadas debido a la formación de la estructura de chalcona, resultante de la degradación de los grupos sustituyentes.

A continuación, se muestran los espectros de absorción en el rango UV-Vis de las disoluciones de enocianinas obtenidas.

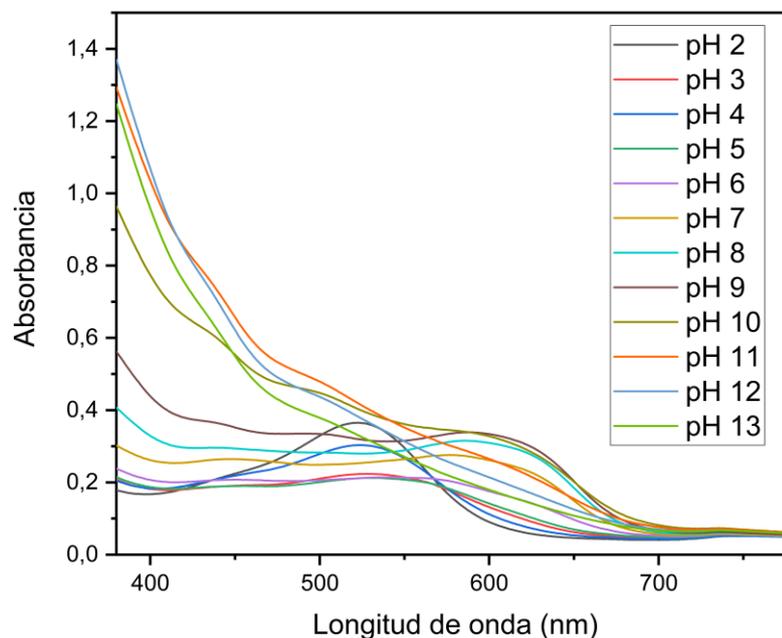


Figura 27. Espectros UV-Vis de las disoluciones de enocianinas obtenidas con un rango de pH de 2 a 13.

Para longitudes de onda ligeramente inferiores a 400 nm, pertenecientes al rango UV, se observa cómo las disoluciones presentan una mayor capacidad de absorción de radiación UV en condiciones básicas o alcalinas, obteniéndose valores de absorbancia superiores al 1,3. En cambio, en condiciones ácidas la capacidad de absorción disminuye notablemente, obteniéndose valores inferiores a 0,30 de absorbancia. En el rango UV-Vis la absorbancia de las disoluciones disminuye notablemente con el aumento de la longitud de onda, obteniéndose, en todos los casos, valores de absorbancia cercanos a

IV. Resultados y discusión

0,10 a los 700 nm. Por último, a pesar de que no se observan picos significativos de máxima absorción, cabe destacar la presencia de picos de absorción a 520 nm correspondientes a las disoluciones con valores de pH de 2 y 4 y a 600 nm, correspondientes a las disoluciones con valores de pH de 7, 8 y 9.

IV.2. Caracterización de los films con comportamiento halocrómico.

IV.2.1. Caracterización mecánica.

IV.2.1.1. Ensayo de tracción.

El ensayo de tracción permite estudiar y analizar el comportamiento mecánico del material cuando este es sometido a una carga uniaxial de tracción cuasi estática hasta la rotura. Mediante los ensayos de tracción se han podido determinar la resistencia a la tracción ($\sigma_{\text{máx}}$), el módulo de Young (E) y el alargamiento a la rotura (ϵ) de las películas. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4. Resumen de las propiedades mecánicas de las películas de zeína con diferentes composiciones de enocianinas, obtenidas mediante ensayos de tracción.

	Resistencia a la tracción, $\sigma_{\text{máx}}$ (MPa)	Módulo de Young, E (MPa)	Alargamiento de rotura, ϵ (%)
Zeína	6,80 ± 1,20	208 ± 75,9	3,80 ± 1,20
Zeína_1,5eno	12,0 ± 4,01	283 ± 164	4,40 ± 1,70
Zeína_3eno	11,9 ± 6,22	288 ± 64,8	3,70 ± 2,20
Zeína_4,5eno	13,9 ± 4,21	486 ± 165	4,30 ± 1,30
Zeína_6eno	7,28 ± 2,16	419 ± 247	3,70 ± 1,20

IV. Resultados y discusión

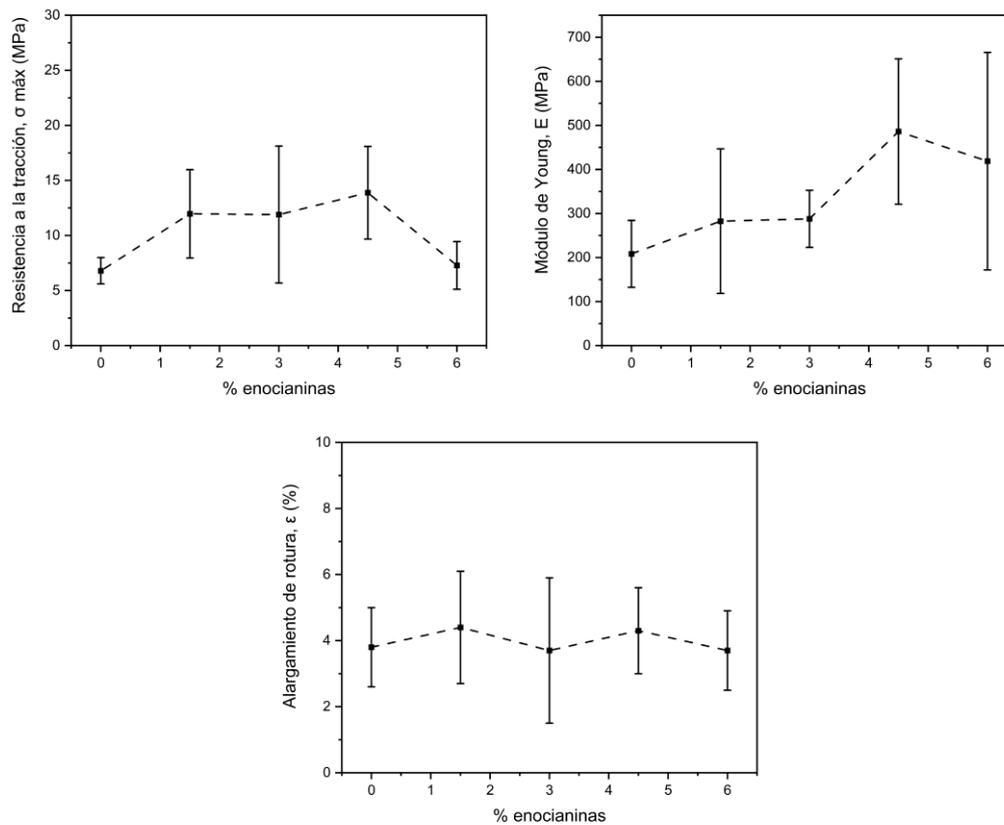


Figura 28. Representaciones gráficas de la variación de las propiedades mecánicas de las películas de zeína con diferentes composiciones de enocianinas.

En la primera de las gráficas de la **Figura 28** se observa un aumento de la resistencia a la tracción de las películas a medida que se aumenta la carga de enocianinas utilizada. Para la película Zeína se obtiene una resistencia a la tracción de 6,80 MPa, valor muy inferior a los obtenidos en las películas Zeína_1,5eno y Zeína_3eno, los cuales se mantienen en los 12 MPa. La máxima resistencia a la tracción se obtiene en la película Zeína_4,5eno con un valor de 4,21 MPa; sin embargo, al emplear un 6 % de enocianinas la resistencia a la tracción disminuye hasta los 7,28 MPa, valor ligeramente superior al obtenido en la película de Zeína. Esta misma tendencia se repite en los resultados correspondientes al módulo de Young, ya que esta es una propiedad que muestra la relación o ratio entre la tensión y la elongación en la zona de comportamiento lineal. La

IV. Resultados y discusión

película Zeína presenta el valor mínimo de 208 MPa, seguido de los 283 y 288 MPa obtenidos en las películas de Zeína_1,5eno y Zeína_3eno, respectivamente. El valor máximo del módulo de Young máximo se corresponde al obtenido en la película Zeína_4,5 con un valor de 486 MPa, más del doble del valor obtenido en la película Zeína. A pesar del aumento del módulo de Young, la película de Zeína_6eno presenta un valor de 419 MPa, inferior al de la película Zeína_4,5 y muy superior al de las películas Zeína_1,5eno y Zeína_3eno. Por último, con respecto a los resultados de alargamiento a la rotura, no se observa una tendencia significativa. Los valores obtenidos se mantienen en un rango comprendido entre el 3,70, correspondientes a las películas de Zeína_3eno y Zeína_6eno, y el 4,40 %, correspondiente a la película de Zeína_1,5eno.

Según Jiang, Guangyang, *et al.* [45] esta mejora en las propiedades mecánicas se debe a la interacción entre las moléculas de antocianinas y las moléculas de la matriz formadora de la película, lo que da lugar a la formación de enlaces de hidrógeno que mejoran la densidad de las películas poliméricas. Resultados similares se han obtenido en el estudio realizado por Zhang, Kailong, *et al.* [46] donde la utilización de pequeñas concentraciones de antocianinas mejora las propiedades mecánicas; sin embargo, la aplicación de concentraciones excesivas supone alteraciones en la red polimérica, lo que se traduce en la disminución de las propiedades mecánicas, tal y como se ha observado en este trabajo.

IV.2.2. Caracterización térmica.

IV.2.2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite identificar las distintas transiciones térmicas del material en estudio al ser sometido a un programa térmico en condiciones controladas. La información se muestra mediante las denominadas curvas calorimétricas, las cuales representan la variación de energía o de potencia eléctrica suministrada en función de la temperatura y del tiempo. En este caso, mediante el análisis de las curvas calorimétricas solamente se han podido determinar las

IV. Resultados y discusión

temperaturas de transición vítrea (T_g) de cada una de las películas, ya que, las demás transiciones térmicas se encuentran fuera del rango de temperaturas de trabajo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos (Tabla 5 y Figura 29).

Tabla 5. Temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

	Temperatura de transición vítrea, T_g (°C)
Zeína	82,1
Zeína_1,5eno	82,0
Zeína_3eno	74,0
Zeína_4,5eno	74,6
Zeína_6eno	73,6

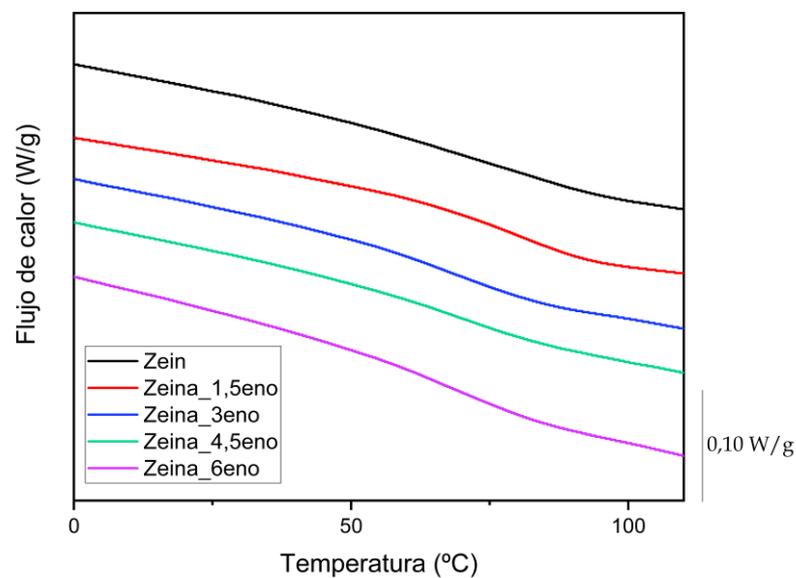


Figura 29. Curvas calorimétricas de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En cada una de las curvas calorimétricas representadas en el gráfico anterior, se observan saltos de la línea base correspondientes al rango de temperatura en el cual se

IV. Resultados y discusión

identifica la temperatura de transición vítrea (T_g). A simple vista, se observa cómo estos saltos de la línea base se producen a temperaturas ligeramente inferiores a medida que aumenta la concentración de enocianinas. En la película Zeína se ha obtenido un valor máximo de T_g de 82,1 °C, el cual ha ido disminuyendo hasta alcanzar los 73,6 °C correspondientes a la película de Zeína_6eno.

Resultados similares se han obtenido en el estudio realizado por Thakur, Rahul, *et al.* [47] donde el aumento de la concentración de antocianinas reduce las temperaturas de transición vítrea de las películas poliméricas desarrolladas a base de alcohol polivinílico (PVA).

IV.2.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA).

Los análisis termogravimétricos (TGA) permiten estudiar los procesos de degradación de los materiales y analizar su estabilidad térmica. En este caso, mediante los análisis termogravimétricos (TGA) se ha determinado la variación de la masa de las películas con respecto a la temperatura, alcanzando temperaturas superiores a las aplicadas en el ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la **Figura 30** se muestra la representación gráfica de las denominadas curvas TGA, las cuales indican la variación del % de masa de cada muestra con el aumento de la temperatura de 30 a 700 °C. Con el fin de determinar la temperatura de degradación con mayor precisión, se ha realizado la primera derivada las curvas TGA (DTG), obteniendo la velocidad de degradación de cada muestra, las cuales han sido representadas en la **Figura 31** en función de la temperatura. En las curvas TGA representadas, se observan tres etapas claramente diferenciables. La primera, se corresponde con un proceso de degradación de 30 a 200 °C debido a la pérdida de humedad. La segunda etapa, se produce entre los 200 y 380 °C y se atribuye a la pérdida de fracciones proteicas de bajo peso molecular y a la pérdida de glicerol. Por último, la tercera etapa está relacionada con la degradación de la zeína y de las enocianinas y se

IV. Resultados y discusión

comprende entre los 280 y 500 °C. Perfiles similares se han obtenido en Rojas-Lema, Sandra, *et al.* [44].

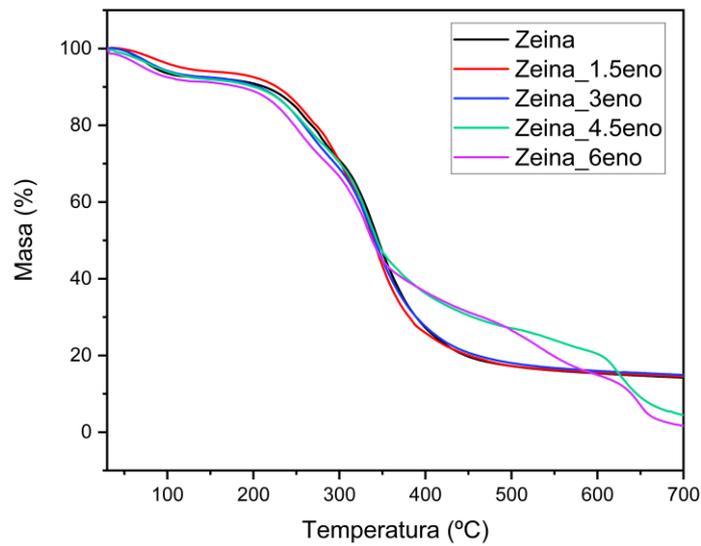


Figura 30. Gráfico TGA variación de la masa de las muestras con la temperatura.

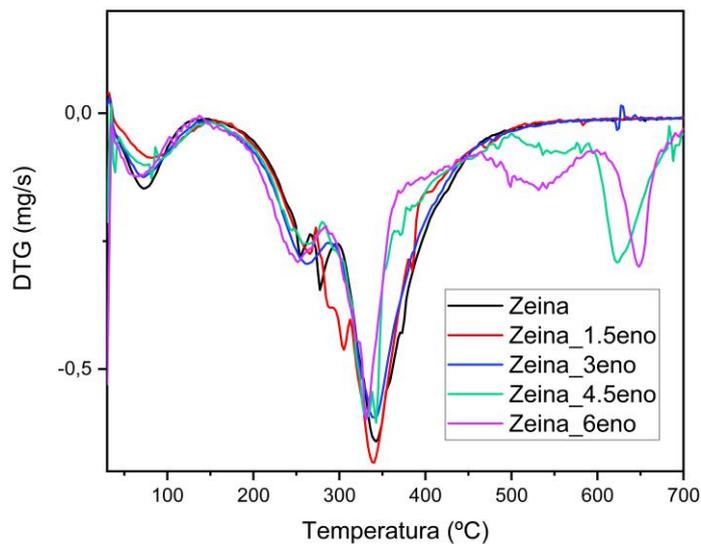


Figura 31. Gráfico DTG variación de la velocidad de degradación de las muestras con la temperatura.

IV. Resultados y discusión

En la **Tabla 6** se muestran los principales parámetros térmicos extraídos de los gráficos TGA y DTG. En esta se representan la temperatura a la cual se produce una pérdida del 5 % de masa por parte de la muestra ($T_{5\%}$), la temperatura máxima de degradación ($T_{m\acute{a}x}$) y la masa residual de las muestra una vez finalizado el ensayo.

Tabla 6. Parámetros térmicos de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidos mediante los análisis termogravimétricos.

	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	Masa residual (%)
Zeína	84,0 ± 3,00	343 ± 20,0	14,2 ± 0,500
Zeína_1,5eno	116 ± 5,00	340 ± 36,0	14,5 ± 0,900
Zeína_3eno	91,0 ± 14,0	343 ± 15,0	14,9 ± 0,700
Zeína_4,5eno	88,0 ± 4,00	343 ± 57,0	4,50 ± 0,200
Zeína_6eno	73,0 ± 12,0	331 ± 20,0	1,70 ± 0,100

El aumento de la concentración de enocianinas supone cambios significativos con respecto a la temperatura correspondiente a la pérdida del 5 % de masa por parte de la muestra ($T_{5\%}$). En el caso de la película Zeína se obtiene una $T_{5\%}$ de 84,0 °C, valor que aumenta hasta los 116 °C para la película Zeína_1,5eno. A partir de dicha temperatura, el aumento de la concentración de enocianinas reduce la $T_{5\%}$, hasta alcanzar un valor de 73,0 °C para la película Zeína_6eno.

En el gráfico DTG (**Figura 31**), se observan picos máximos sobre los 343 °C, correspondientes a las temperaturas máximas de degradación ($T_{m\acute{a}x}$) de las muestras analizadas. En este caso, el aumento de la concentración de enocianinas no supone cambios significativos en este parámetro. Las muestras analizadas, presentan una $T_{m\acute{a}x}$ cercana a los 343 °C; sin embargo, cabe destacar una disminución de dicha temperatura en la película Zeína_6eno, la cual presenta una $T_{m\acute{a}x}$ de 331 °C.

Por último, con respecto al % de masa residual las películas Zeína, Zeína_1,5eno y Zeína_3eno presentan valores superiores al 14,0 %. En cambio, se observa una disminución significativa en las películas Zeína_4,5eno y Zeína_6eno, donde se alcanzan

IV. Resultados y discusión

valores de 4,50 y 1,70 respectivamente. Observando el gráfico TGA (**Figura 30**) este comportamiento puede deberse a que en ambas muestras la tercera etapa de degradación, correspondiente a la zeína y a las enocianinas, se inicia a menores temperaturas, sobre los 360 °C.

IV.2.3. Caracterización morfológica.

IV.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

Se han obtenido imágenes de la superficie de fractura de las películas desarrolladas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Estas imágenes permiten analizar la estructura interna de las películas y, por tanto, justificar y corroborar las propiedades y el comportamiento mecánico, químico y físico de las películas.

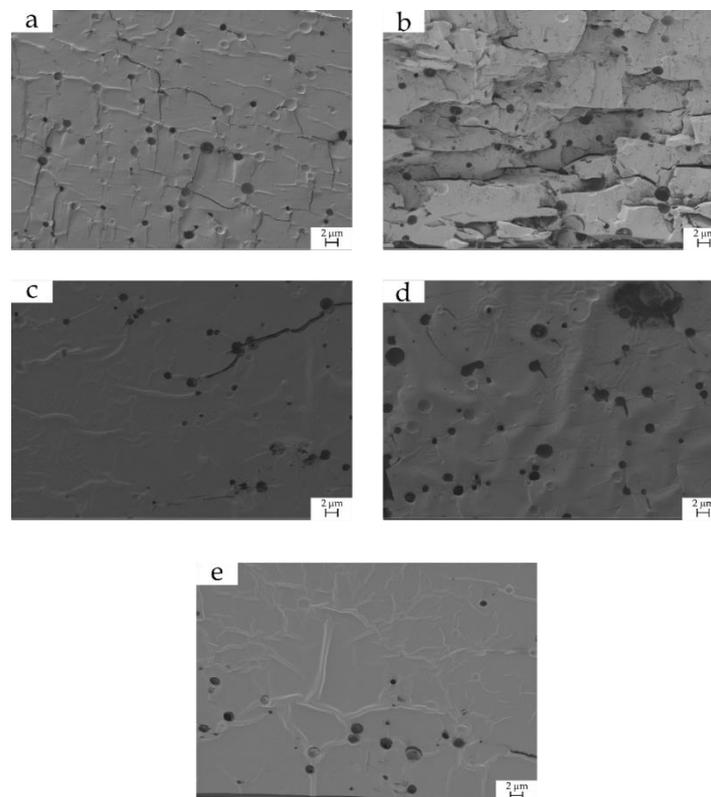


Figura 32. Morfología de las superficies de fractura de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas (% en peso): a) 0, b) 1,5, c) 3, d) 4,5 y e) 6. Barra de escala 2 µm.

IV. Resultados y discusión

Tal y como se puede observar, la película Zeína presenta una estructura bastante homogénea, aunque se observa la presencia de ciertas microfisuras y microhuecos. Sessa, David J., *et al.* [48] han descrito la presencia de microhuecos en films de zeína plastificada con polivinilpirrolidona (PVP). De hecho, estos huecos se deben a la presencia de burbujas de aire atrapadas. Como indica Bouman, Jacob, *et al.* [49], estos microhuecos pueden deberse a la humedad residual durante el procesado o, simplemente, al mezclado mecánico en la extrusora. Estos microhuecos pueden ser responsables de la baja elongación a la rotura observada en las películas, ya que actúan como concentradores de tensión.

A medida que se aumenta la composición de enocianinas, la estructura de las películas muestra una mayor homogeneidad y, además, una menor presencia de microfisuras y microhuecos, especialmente, en las películas Zeína_1,5eno y Zeína_6eno. Tal y como se ha comentado anteriormente, esta mayor homogeneidad en la estructura de las películas con el aumento en las composiciones de enocianinas puede deberse a la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de enocianinas y las moléculas de la matriz de zeína tal y como ha descrito Jiang, Guangyang, *et al.* [45], lo que supone una mayor densidad de las películas halocrómicas. Este aumento en la densidad mejora las propiedades mecánicas de las películas, como se ha indicado anteriormente, debido al papel que desempeñan los microhuecos en las propiedades finales.

Resultados similares se han obtenido en el estudio realizado por Rojas-Lema, Ghorbani, Mahdi, *et al.* [50] donde se reduce la presencia de microdefectos con la presencia antocianinas en la fabricación de películas poliméricas desarrolladas a base de ácido poliláctico (PLA), polietilenglicol (PEG) y bentonita de calcio (CB).

IV. Resultados y discusión

IV.2.4. Caracterización superficial.

IV.2.4.1. Fotografía óptica.

Se ha evaluado el aspecto macroscópico de las películas desarrolladas mediante fotografía óptica, empleando el logo de la Universitat Politècnica de València como fondo de contraste para determinar la tonalidad de color y la transparencia. En la **Figura 33**, se muestran las fotografías realizadas a cada una de las películas.



Figura 33. Imágenes de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas, obtenidas mediante fotografía óptica.

A simple vista, se pueden apreciar las variaciones de color correspondientes a la adición de distintas concentraciones de enocianinas. La película Zeína, con un 0 % de enocianinas, presenta un color amarillo y su transparencia permite visualizar claramente el fondo de contraste. Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de enocianinas, las películas presentan tonalidades más oscuras, llegando a observar un color marrón/anaranjado en la película Zeína_6eno. Además, este aumento en la concentración reduce ligeramente la transparencia, obteniendo una mayor opacidad en las películas.

IV. Resultados y discusión

IV.2.4.2. Colorimetría.

Se han determinado las coordenadas colorimétricas CIELab de cada una de las películas y se ha evaluado la variación de color de estas en función de la concentración de enocianinas utilizada en su fabricación mediante la **Ecuación 2**, empleando, en este caso, las coordenadas colorimétricas de la película Zeína como valores de referencia. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Coordenadas colorimétricas CIELab de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

	Luminosidad, L^*	Rojo-verde, a^*	Amarillo- azul, b^*	ΔE
Zeína	$39,4 \pm 0,387$	$-0,242 \pm 0,150$	$13,8 \pm 0,710$	---
Zeína_1,5eno	$35,1 \pm 1,345$	$1,05 \pm 0,181$	$9,34 \pm 1,18$	6,35
Zeína_3eno	$30,9 \pm 0,661$	$1,99 \pm 0,258$	$6,88 \pm 0,390$	11,2
Zeína_4,5eno	$27,8 \pm 0,427$	$3,10 \pm 0,166$	$4,82 \pm 0,360$	15,1
Zeína_6eno	$26,7 \pm 0,596$	$3,50 \pm 0,174$	$3,63 \pm 0,610$	16,7

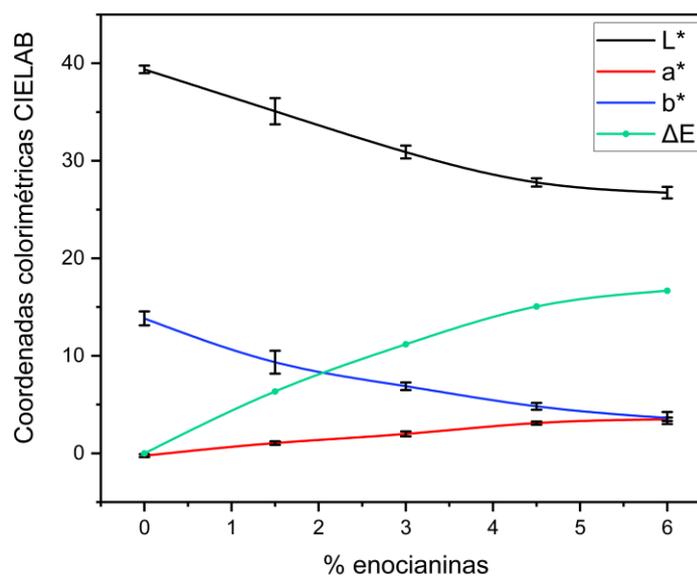


Figura 34. Representación gráfica de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

IV. Resultados y discusión

En términos de luminosidad, L^* , se observa una clara disminución al aumentar la concentración de enocianinas utilizadas, desde valores cercanos a 40,0 hasta valores ligeramente superiores a los 25,0, correspondientes a las películas Zeína y Zeína_6eno, respectivamente. La misma tendencia se observa en la coordenada b^* , correspondiente a la coordenada de color de azul a amarillo. El aumento de la concentración de enocianinas, supone una disminución desde valores cercanos a 14,0 para la película Zeína hasta un valor de 3,63 para la película Zeína_6eno. En cambio, en los valores de la coordenada a^* (cambio de verde a rojo), a pesar de que los valores se mantienen en un rango muy estrecho comprendido entre -0,242 y 3,50, se observa un ligero aumento a medida que se utilizan mayores concentraciones de enocianinas, marcado por un color más anaranjado/marrón con mayor contenido de rojo. Por último, con respecto a la variación de color (ΔE) esta aumenta con el contenido de enocianinas, como era de esperar con la simple observación de las imágenes ópticas.

Estos resultados presentan una gran relación con los obtenidos en fotografía óptica. Con el aumento en la concentración de enocianinas los films presentan tonalidades más oscuras, lo que supone una pérdida de luminosidad. Con respecto a las coordenadas a^* y b^* , la aplicación de enocianinas supone una pérdida del color amarillo de la zeína y un aumento del color rojo, lo que se traduce en la disminución de la coordenada b^* y un aumento de la coordenada a^* , respectivamente.

Resultados similares se obtienen en el estudio realizado por Nogueira, Gislaine Ferreira, *et al.* [51] donde las coordenadas colorimétricas y la variación total de color de las películas desarrolladas a base de almidón y antocianinas presentan las mismas tendencias que las observadas en el presente trabajo.

IV.2.4.3. Transparencia UV-Vis y espesor.

Mediante el ensayo de transparencia UV-Vis se ha podido estudiar cómo interfieren las películas con base zeína en el paso de radiación UV-Vis en función del

IV. Resultados y discusión

contenido en enocianinas. Para ello, previamente, se ha determinado el % de transmitancia y el espesor de cada película y, mediante el empleo la **Ecuación 3**, se ha obtenido el % de transparencia. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8. Resultados del % de transmitancia, espesor y % de transparencia de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

	Transmitancia (%)	Espesor (mm)	Transparencia (%)
Zeína	54,5 ± 0,072	0,070	24,8
Zeína_1,5eno	52,1 ± 0,009	0,060	28,6
Zeína_3eno	51,6 ± 0,074	0,072	23,8
Zeína_4,5eno	38,4 ± 0,163	0,100	15,8
Zeína_6eno	35,9 ± 0,051	0,069	22,5

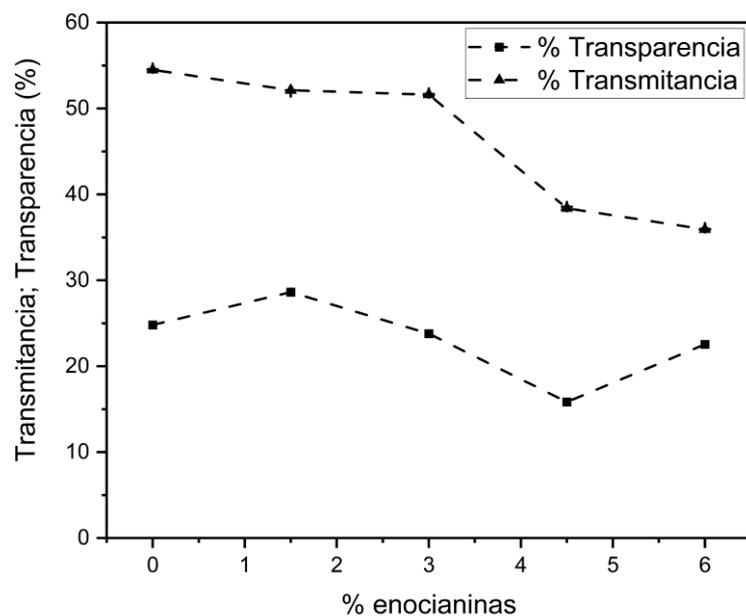


Figura 35. Representación gráfica de la variación de la transmitancia y transparencia de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

IV. Resultados y discusión

Tal y como se puede observar, se produce una clara disminución de la transmitancia a medida que aumenta la concentración de enocianinas utilizada. Las películas Zeína, Zeína_1,5eno y Zeína_3eno presentan valores de transmitancia ligeramente superiores al 50,0 %. En cambio, en las películas Zeína_4,5eno y Zeína_6eno se produce una brusca disminución de la transmitancia obteniéndose valores del 38,4 y 35,9 %, respectivamente.

Con respecto a la transparencia de las películas, esta varía entre valores comprendidos entre el 15,0 y el 30,0 %, sin mostrar ninguna tendencia clara. A pesar de que la transparencia varía en función de la transmitancia, también varía en función del espesor. En este caso, se han obtenido valores de espesor muy semejantes de 0,060 y 0,070 mm. Sin embargo, cabe destacar el espesor obtenido en la película Zeína_4,5eno de 0,100 mm que, al ser inversamente proporcional al % de transparencia, se ha determinado una transparencia de 15,8 %, valor inferior en comparación con los obtenidos en el resto de las películas, los cuales se han mantenido por encima del 20,0 %.

IV.2.4.4. Goniometría óptica.

La goniometría óptica aporta una información muy relevante acerca de la humectabilidad superficial. En este trabajo se ha determinado el ángulo de contacto (θ) formado por una gota de agua destilada depositada sobre la superficie de las películas con diferente contenido de enocianinas (**Tabla 9**).

Tabla 9. Ángulos de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de, obtenidos mediante goniometría óptica.

	Ángulo de contacto, θ (°)
Zeína	46,2 ± 0,153
Zeína_1,5eno	41,4 ± 2,71
Zeína_3eno	37,5 ± 0,898
Zeína_4,5eno	29,3 ± 0,971
Zeína_6eno	39,5 ± 0,723

IV. Resultados y discusión

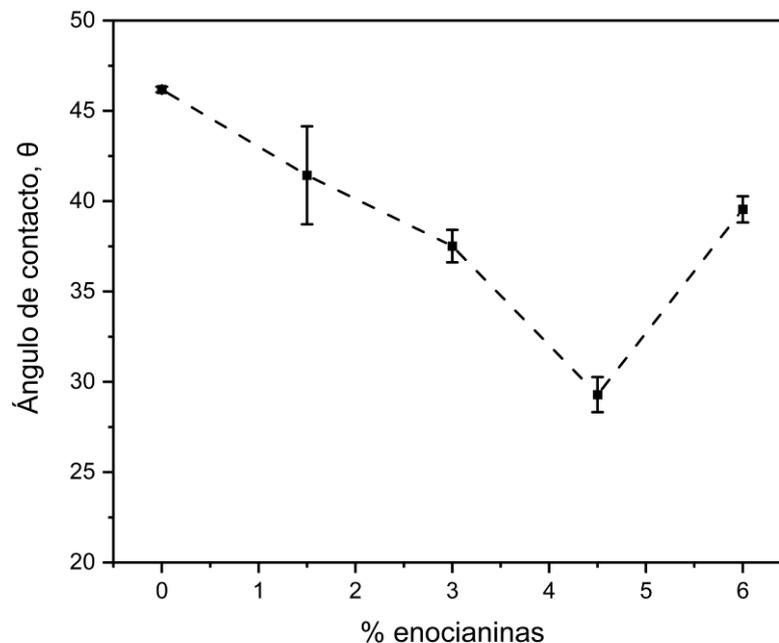


Figura 36. Representación gráfica de la variación del ángulo de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

Tal y como se muestra en la **Figura 36**, el ángulo de contacto formado por la gota de agua destilada sobre la superficie de las películas disminuye con el aumento de la concentración de enocianinas. El mayor ángulo de contacto se obtiene sobre la superficie de la película Zeína, dando un valor de $46,2^\circ$; sin embargo, el aumento de la concentración de enocianinas supone la disminución del ángulo de contacto desde los $46,2^\circ$ hasta los $29,3^\circ$ obtenidos en la película Zeína_4,5eno. A pesar dicha disminución, en el caso de la película Zeína_6eno, el ángulo de contacto obtenido presenta un valor de $39,5^\circ$, el cual no se corresponde con la tendencia seguida por el resto de las películas, incluso llega a superar el ángulo de contacto obtenido en la película Zeína_3eno de $37,5^\circ$.

Tal y como se ha podido observar, en general, la aplicación de enocianinas aumenta el comportamiento hidrófilo de los films halocrómicos. Este efecto puede

IV. Resultados y discusión

deberse a la naturaleza polar de las encianinas, lo que se traduce en una mayor afinidad del film por el agua.

IV.2.5. Otras técnicas de caracterización.

IV.2.5.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Mediante la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se han podido identificar los grupos funcionales de las moléculas que componen las películas halocrómicas desarrolladas. Cuando se hace incidir sobre las muestras radiación infrarroja los enlaces de las moléculas absorben energía asociada a los modos de deformación y/o vibración. Esta información se recoge en los espectros FTIR. En la **Figura 37**, se muestran los espectros FTIR obtenidos para las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas. En estos se muestran una serie de bandas de absorción, de manera que cada una de ellas se corresponde con un movimiento vibracional de un enlace específico de una molécula determinada o grupo funcional.

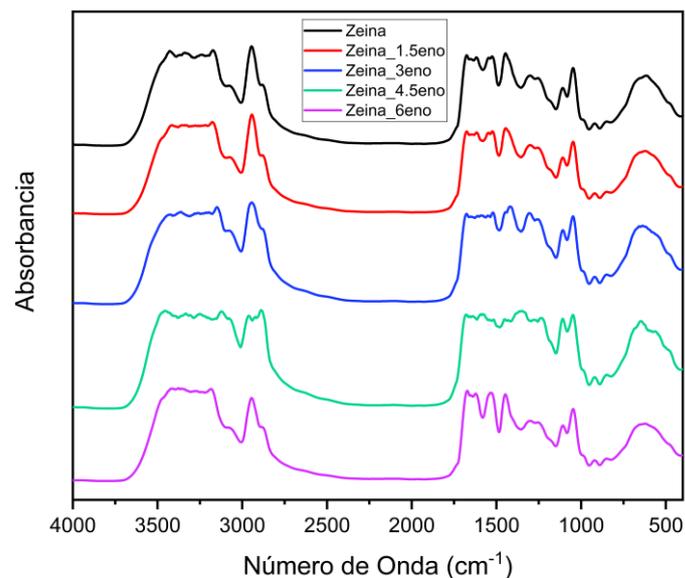


Figura 37. Espectros FTIR de las películas de zeína con distintas composiciones de encianinas.

IV. Resultados y discusión

En el caso de las proteínas, estas suelen mostrar nueve bandas de absorción; sin embargo, los picos de absorbancia más significativos corresponden con las bandas de amida A, I, II y III [52]. La banda de absorción amida A se corresponde con los diferentes picos comprendidos entre $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$. Dentro de dicho rango, se aprecia un pico de absorbancia en 3280 cm^{-1} , asociado a la vibración del grupo O - H. Con respecto a la banda de absorción amida I, esta se encuentra en el rango comprendido ente $1600 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ y es la banda de absorción más intensa de las proteínas. En dicho rango se aprecian los picos de absorción correspondientes a las vibraciones de los enlaces C - O y N - H, este último en menor medida. Entre el rango de $1510 - 1580 \text{ cm}^{-1}$ se encuentra la banda de absorción típica de amida II, debida, principalmente, por las vibraciones de los enlaces N - H, C - N y C - C. Por último, en el rango comprendido entre $1350 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ se encuentra la banda de absorción amida III, relacionada con las vibraciones de los enlaces N - H y C - N, con una señal más débil que las bandas de amida I y amida II.

Tal y como se ha podido observar, los espectros FTIR obtenidos para cada película presentan diferencias prácticamente inapreciables, lo que sugiere que las concentraciones de enocianinas aplicadas sobre las películas de zeína y glicerol no han supuesto cambios significativos en la estructura química de las películas. En todo caso, las interacciones que pueden aportar las enocianinas, se ven notablemente diluidas debido al bajo contenido de estas en las formulaciones, donde predomina la zeína y el glicerol.

IV.2.5.2. Contenido en humedad.

En este apartado se lleva a cabo un estudio del efecto del contenido de enocianinas en la humedad de las películas con base zeína desarrolladas. Se ha determinado el contenido en humedad de las películas a partir de la diferencia entre el peso de las muestras iniciales y el peso de las muestras después de haber sido sometidas a un proceso de secado.

IV. Resultados y discusión

Tabla 10. Resultados del contenido en humedad de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Contenido en humedad (%)
Zeína	8,60	7,40	14,0
Zeína_1,5eno	10,0	9,00	10,0
Zeína_3eno	8,80	8,00	9,09
Zeína_4,5eno	9,70	9,10	6,19
Zeína_6eno	13,4	12,3	8,21

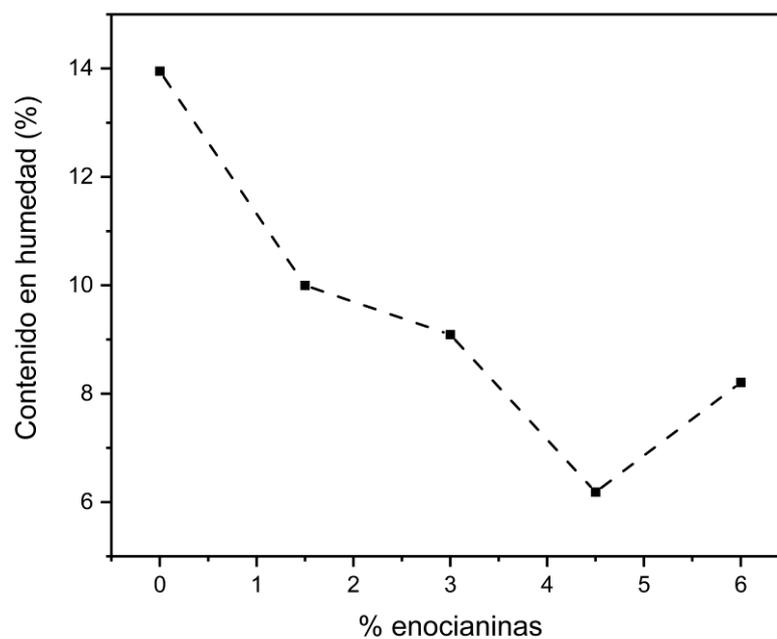


Figura 38. Representación gráfica de la variación del contenido de humedad de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

A simple vista, la figura anterior indica una clara disminución del contenido en humedad de las películas al aumentar la concentración de enocianinas. Esta disminución, se produce desde un valor del 14,0 % correspondiente a la película Zeína hasta el 6,19 % correspondiente a la película Zeína_4,5eno. A pesar de esta disminución,

IV. Resultados y discusión

se produce un aumento del contenido en humedad en la película Zeína_6eno, donde se alcanza un valor del 8,21 %, valor inferior al de la película Zeína3_eno con un 9,09 %.

IV.2.5.3. Solubilidad en agua.

Se ha determinado la solubilidad de las películas mediante la diferencia entre el peso de las muestras iniciales y el peso de las muestras tras un proceso de secado, seguido de un proceso de solubilización en agua destilada y, finalmente, de un segundo proceso de secado. La **Tabla 11** muestra los valores correspondientes al peso inicial y peso tras la solubilización, así como los valores de solubilidad (%), mientras que la **Figura 39** muestra la evolución del % de solubilidad en función de la concentración de enocianinas en las formulaciones con base zeína.

Tabla 11. Resultados de la solubilidad en agua de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

	Peso inicial (mg)	Peso tras solubilizar (mg)	Solubilidad (%)
Zeína	8,60	6,30	14,9
Zeína_1,5eno	10,0	7,30	18,9
Zeína_3eno	8,80	6,60	17,5
Zeína_4,5eno	9,70	7,80	14,3
Zeína_6eno	13,4	8,70	29,3

IV. Resultados y discusión

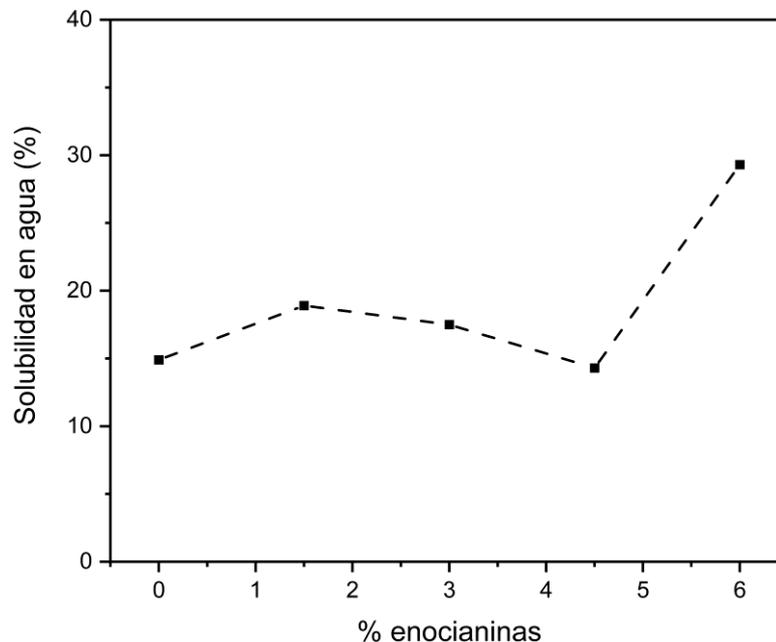


Figura 39. Representación gráfica de la variación de la solubilidad en agua de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

Para las películas con concentraciones de enocianinas de 0; 1,5; 3 y 4,5 % la solubilidad en agua no presenta variaciones significativas. En este caso, los valores se encuentran en un rango muy reducido comprendido entre 14,3 y el 18,9 % de solubilidad correspondientes a las películas de Zeína_4,5eno y Zeína 1,5eno, respectivamente. Sin embargo, sí que se observa un brusco cambio de tendencia con respecto al valor de solubilidad en agua obtenido en la película Zeína_6eno, el cual llega a superar el 29,0 %.

El comportamiento observado de la solubilidad en agua de los films se corresponde al glicerol y a las enocianinas, ya que, tal y como se ha comentado anteriormente, la zeína presenta insolubilidad en agua debido a su elevado contenido en aminoácidos de naturaleza apolar, que aportan hidrofobicidad.

IV.3. Validación de los indicadores halocrómicos.

IV.3.1. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones *in vitro*.

Se ha podido determinar la capacidad halocrómica de las películas al ser sometidas a los vapores resultantes de una disolución al 32 % v/v de amoníaco (NH_3), validando los cambios de color producidos mediante la obtención de imágenes y de las coordenadas colorimétricas.

En la **Figura 40**, se muestran la imágenes obtenidas de las cinco películas ensayadas durante la validación en condiciones *in vitro*, a partir de las cuales, se observa claramente el cambio de color de las películas durante la realización del ensayo.

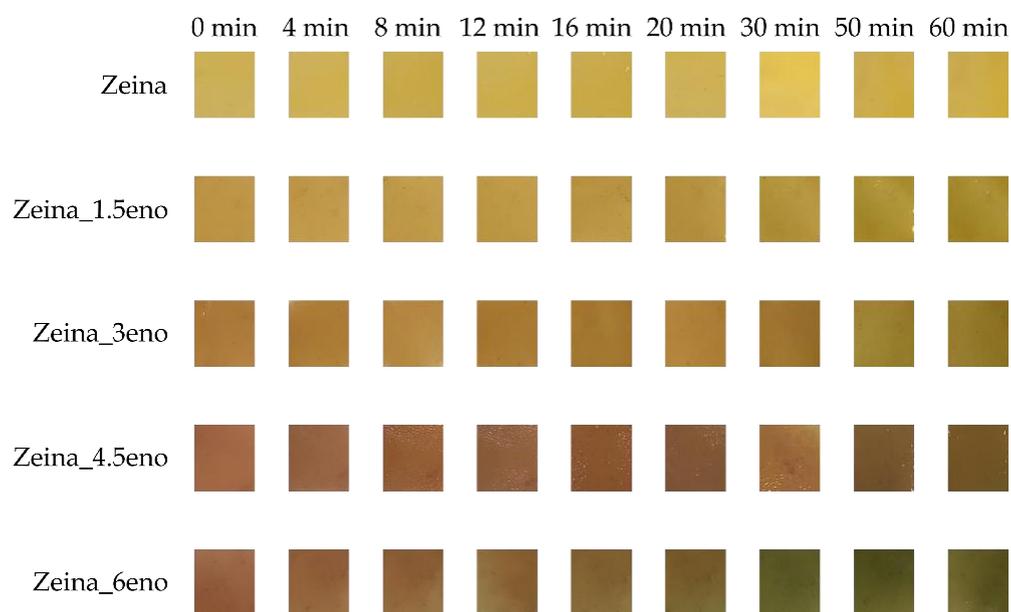


Figura 40. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante la validación en condiciones *in vitro*.

IV. Resultados y discusión

Se observan cambios de color significativos debido tanto a las concentraciones de enocianinas como al tiempo de duración del ensayo. Las películas con una mayor concentración de enocianinas, presentan una mayor diferencia de color entre el tiempo de muestreo inicial y final. En este aspecto, cabe destacar el cambio de color producido en la película Zeína_6eno, con un color rosado a los 0 min que cambia a verde/gris al final del ensayo. También cabe destacar, que los cambios de color no empiezan a observarse con claridad hasta los 16 min, ya que, la concentración de amoníaco volátil en contacto directo con la película va aumentando con el tiempo. Estos cambios de color se intensifican a partir de los 20 min, donde el tiempo de muestreo es cada 10 min.

Para un análisis más detallado, en la **Figura 41** se han representado gráficamente las variaciones de las coordenadas colorimétricas y la diferencia de color total.

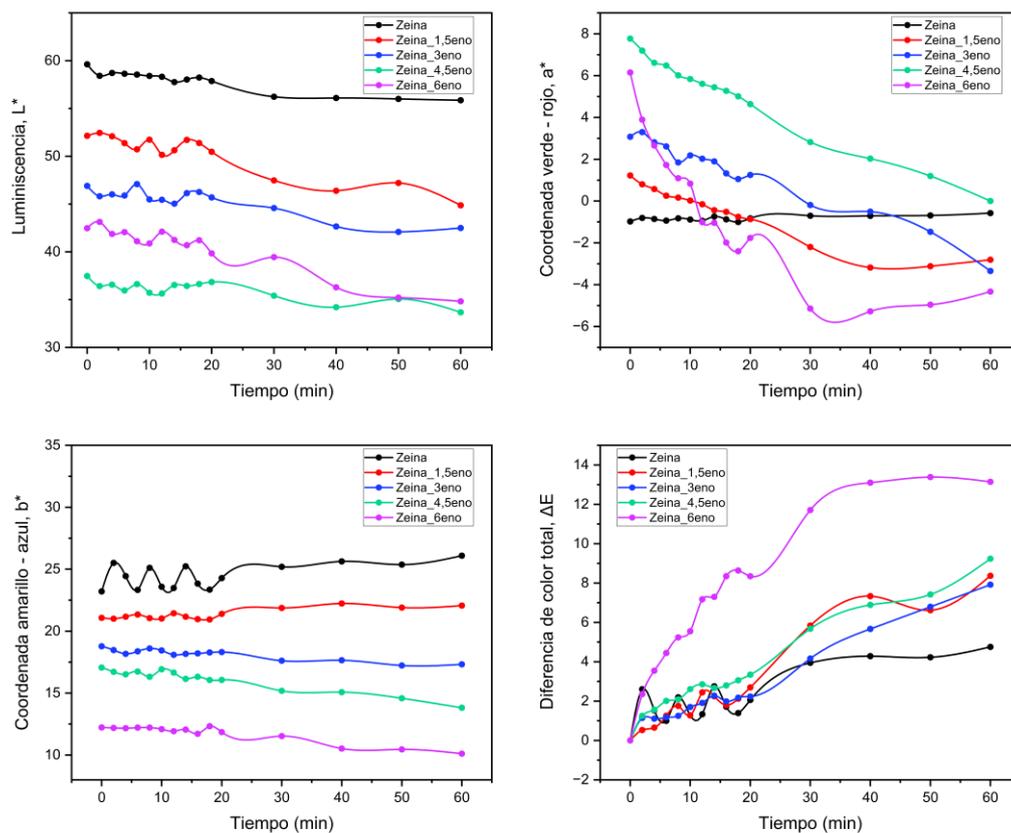


Figura 41. Representaciones gráficas de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab y de la diferencia total de color durante la validación en condiciones *in vitro*.

IV. Resultados y discusión

Se observa una ligera disminución de la luminosidad (L^*) a medida que aumenta el tiempo de duración del ensayo en las cinco películas ensayadas. En cambio, la coordenada a^* presenta una mayor variación. En este caso, en la película Zeína_6eno, se observa una variación de la coordenada a^* que disminuye bruscamente desde un valor de 6,00, a los 0 min, hasta un valor cercano a -5,00, alcanzado a los 30 min, el cual aumenta ligeramente hasta la finalización del ensayo. También se observa una disminución, menos pronunciada, de la coordenada a^* en las películas Zeína_1,5eno, Zeína_3eno y Zeína_4,5eno, mientras que la película Zeína no presenta, prácticamente, ninguna variación. Con respecto a las variaciones de la coordenada b^* , no se observa ninguna variación significativa. Solamente cabe destacar una pequeña disminución producida en las películas Zeína_3eno, Zeína_4,5eno y Zeína_6eno.

Teniendo en cuenta estas variaciones, la película Zeína_6eno es la que presenta una mayor diferencia de color total (ΔE) con respecto al color que presenta la película al inicio del ensayo, seguida de las películas de Zeína_1,5eno, Zeína_3eno y Zeína_4,5eno. A pesar de no presentar enocianinas en su composición, también se observa una diferencia de color en la película Zeína la cual puede ser debida al contacto directo con los vapores de la disolución, aunque esta variación de tonalidad no es significativa y prácticamente no interfiere en los cambios de color debidos al cambio del pH.

IV.3.2. Validación de los indicadores halocrómicos en condiciones *in vivo*.

Se ha podido determinar las propiedades halocrómicas de las películas para su posible aplicación como indicador de pH para la monitorización de la frescura del pescado, validando los cambios de color producidos mediante la obtención de imágenes y de las coordenadas colorimétricas.

A continuación, se muestran la imágenes obtenidas de las cinco películas ensayadas durante la validación en condiciones *in vitro*, a partir de las cuales, se

IV. Resultados y discusión

observan claramente los cambios de color de las películas durante la realización del ensayo.

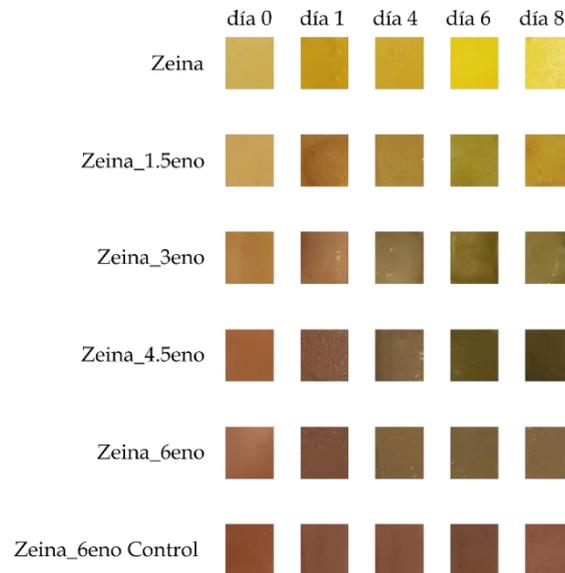


Figura 42. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante la validación en condiciones *in vivo*.

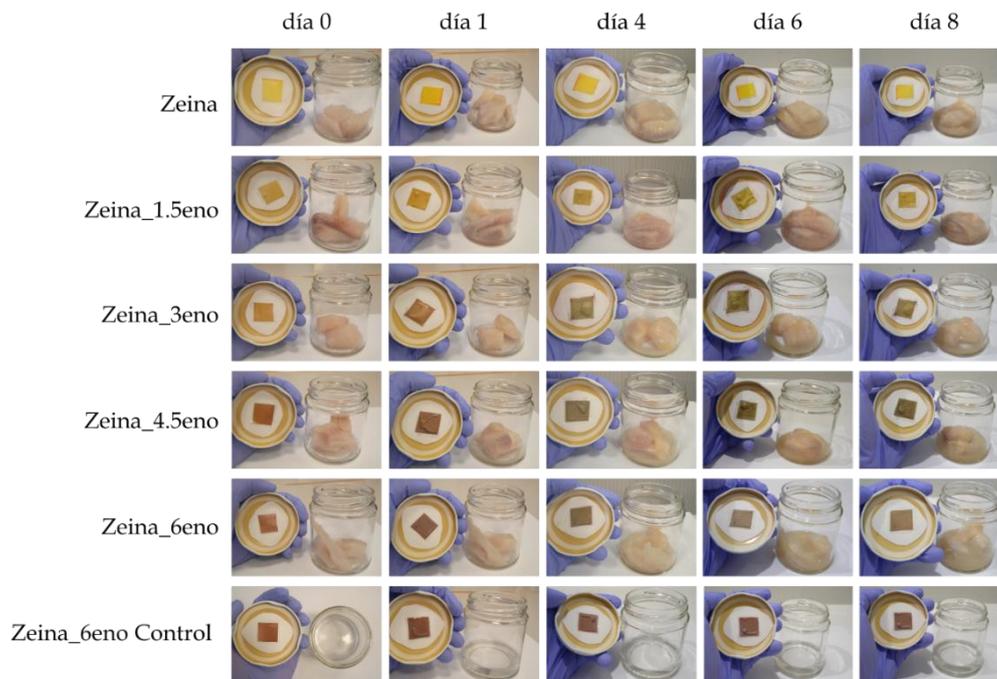


Figura 43. Cambios de color de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas producidos durante su validación como indicadores de pH en la monitorización de pescado fresco.

IV. Resultados y discusión

Para un análisis más detallado, en la **Figura 44** se han representado gráficamente las variaciones de las coordenadas colorimétricas CIELab obtenidas, así como la diferencia de color total de cada una de las películas.

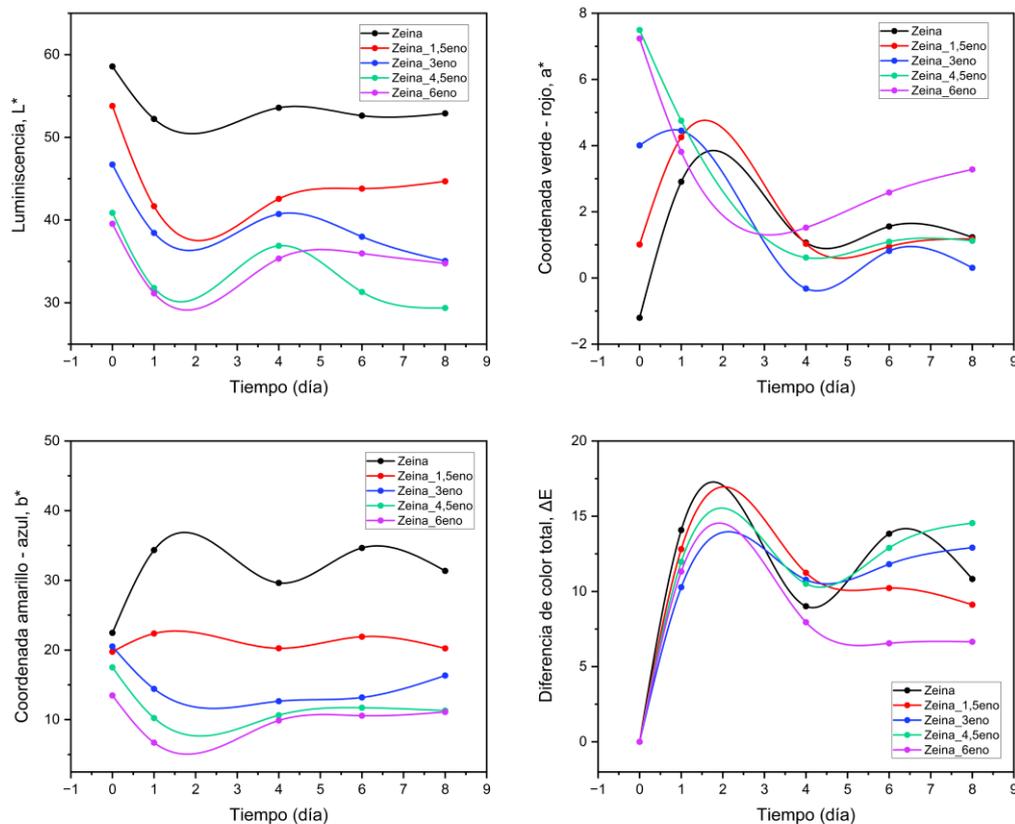


Figura 44. Representaciones gráficas de la variación de las coordenadas colorimétricas CIELab y de la diferencia total de color durante la validación en condiciones *in vivo*.

Después de las primeras 24 h desde la iniciación del ensayo, ya se aprecian cambios de color significativos en las películas. Estos cambios son más significativos a medida que se aumenta la concentración de encianinas, sin embargo, en la película Zeína_6eno el cambio de color se produce hasta el día 4, ya que, las muestras analizadas durante el tiempo restante del ensayo no presentan cambio de color alguno. En cambio,

IV. Resultados y discusión

sí se observan cambios significativos de color durante todos los tiempos de muestreo en las películas Zeína_1,5eno, Zeína_3eno y Zeína_4,5eno, obteniéndose en esta última una mayor diferencia de color entre el día 0 y el día 8. También cabe destacar pequeñas variaciones de color en la película de control, los cuales pueden ser debidas al contacto directo de la película con el vapor de agua de la disolución.

IV.4. Estudio de la biodegradabilidad de los indicadores halocrómicos.

Por último, se ha podido determinar la capacidad de biodegradación de las películas al ser sometidas a ambiente de compostaje controlado en el laboratorio durante un período de 28 días. En la **Figura 45**, se representan las imágenes de las muestras de película extraídas a lo largo del ensayo de biodegradabilidad.

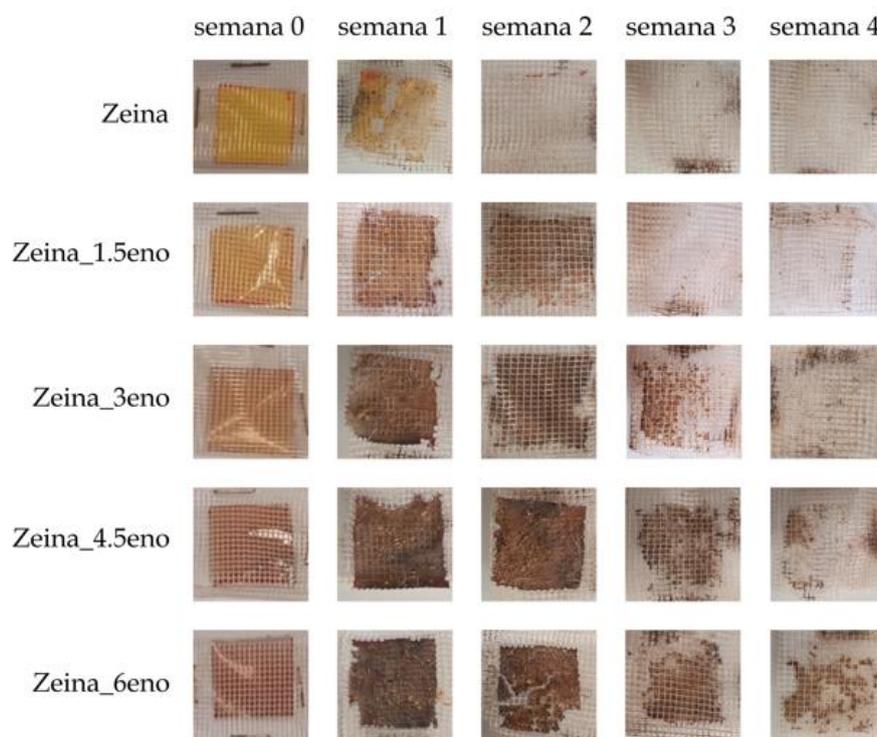


Figura 45. Imágenes progresivas del proceso de biodegradación de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

IV. Resultados y discusión

A simple vista, se observa claramente la variación de la capacidad de degradación o desintegración en condiciones de compost de las películas en función de la concentración de enocianinas utilizadas en su fabricación y del tiempo de exposición a las condiciones de degradación controladas. Después de la primera semana de ensayo, se observan claros signos de degradación, especialmente, en los films de Zeína y Zeína_1,5eno. Después de dos semanas, se observa una degradación total del film Zeína y la aparición de signos más claros de degradación en el resto de los films, exceptuando el film de Zeína_4,5eno. En las muestras extraídas en la semana 3, se observa una degradación total del film Zeína_1,5eno y un aumento considerable de la degradación de los films restantes. Finalmente, en la semana 4 se observa una degradación total del film Zeína_3eno; sin embargo, a pesar de observar claros signos de degradación en los films de Zeína_4,5eno y Zeína_6eno, la degradación no llega a ser total.

Con estos resultados, se puede deducir que la cantidad de enocianinas utilizada en la fabricación de los films ha condicionado la velocidad su de degradación, siendo esta menor a medida que se aumenta la concentración de enocianinas. No obstante, el tiempo de biodegradación o desintegración se mantiene en un período razonablemente corto, alcanzando la total desintegración en un período máximo de 4 semanas, en prácticamente todas las formulaciones desarrolladas.

Por último, cabe destacar que debido a la fragilidad y al poco espesor de los films, estos no han podido ser extraídos de la rejilla, por lo que no se ha podido determinar el peso de las muestras después del proceso de secado. Por tanto, a pesar de observar claros signos de desintegración por parte de los films, no se ha podido determinar el % de material degradado de cada muestra extraída.

IV. Resultados y discusión

**V. CONCLUSIONES Y LÍNEAS
FUTURAS**

CONCLUSIONES Y
LÍNEAS FUTURAS

V. Conclusiones y líneas futuras

V.1. Conclusiones.

De acuerdo con los objetivos establecidos y en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

En líneas generales y según los objetivos planeados, se han desarrollado films halocrómicos a partir de una matriz polimérica de base zeína y glicerol con la aplicación de distintas cargas de enocianinas. Posteriormente, mediante la aplicación de diversas técnicas de caracterización se han determinado sus principales propiedades, así como su validez como indicadores de pH para la monitorización del deterioro de pescado fresco envasado.

Con respecto a la caracterización del comportamiento halocrómico de las enocianinas, se han podido observar ópticamente y mediante espectroscopía UV-Vis los cambios de color producidos en las disoluciones de enocianinas debido a los cambios estructurales resultantes de las variaciones de pH. Se han observado cambios de color rosados en pH=2 y 3 a colores amarillos/marrones a pH=12 y 13.

Con respecto a las propiedades mecánicas de los films halocrómicos, se ha observado una mejora en la resistencia a la tracción ($\sigma_{m\acute{a}x}$) y en el módulo de Young (E) con el aumento de la concentración de enocianinas, obteniéndose valores máximos en la película Zeína_4eno de 13,9 y 486 MPa, respectivamente. A pesar de estas mejoras, la adición del 6 % de enocianinas supone un cambio de tendencia, ya que, las propiedades mecánicas disminuyen con respecto a los valores de la película Zeína_4eno. Los valores de alargamiento a la rotura (ϵ) no han presentado variación alguna, manteniéndose en un rango comprendido entre 3,70 y 4,40 %.

Con respecto a las propiedades térmicas de los films halocrómicos, el aumento de la concentración de enocianinas supone una disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas. La temperatura máxima de degradación ($T_{m\acute{a}x}$) se ha mantenido cercana a los 343 °C para todas las películas, exceptuando la película Zeína_6eno con un valor inferior de 331 °C. En relación con la masa residual, las películas Zeína, Zeína1,5eno y Zeína3_eno presentan valores superiores al 14,0 %, en cambio las

V. Conclusiones y líneas futuras

películas Zeína_4,5eno y Zeína_6eno presentan valores muy inferiores de 4,50 y 1,70 %, respectivamente.

Con respecto a las propiedades morfológicas de los films halocrómicos, la presencia de enocianinas ha supuesto una mayor homogeneidad estructural de las películas, así como una menor presencia de microfisuras y microhuecos, especialmente en las películas Zeína_1,5eno y Zeína_6eno, posible razón por la que se ha observado una mejora de las propiedades mecánicas.

Con respecto a las propiedades superficiales de los films halocrómicos, la presencia de enocianinas implica una pérdida de luminosidad y transparencia, además de una pérdida del color amarillo correspondiente a la zeína y un aumento del color rojo. Por otro lado, debido a la naturaleza polar de las enocianinas, los valores de ángulo de contacto (θ) entre la superficie de las películas y agua destilada disminuyen con la presencia de las enocianinas, lo que se traduce en un aumento del comportamiento hidrófilo de los films halocrómicos.

Debido al bajo contenido de enocianinas con respecto a la zeína y glicerol utilizados en la fabricación de los films, no se han observado cambios significativos en los espectro FTIR. En relación con el contenido en humedad, este disminuye con el aumento de la concentración de enocianinas, desde el 14,0 % al 6,19 %, valores correspondientes a las películas de Zeína y Zeína_4,5eno, respectivamente. En cambio, el contenido en humedad de la película Zeína_6,5eno disminuye hasta el 8,21 %. En general la presencia de enocianinas no ha interferido notablemente en la solubilidad de los films en agua, ya que, esta se ha mantenido con valores inferiores al 20,0 %; sin embargo, se ha observado un aumento en la solubilidad de la película Zeína_6eno, cuyo valor se sitúa en el 29,3 %. Debido a la insolubilidad de la zeína en agua, este cambio se atribuye a la presencia de glicerol y enocianinas.

Con respecto a las validaciones en condiciones *in vitro* e *in vivo* de los films halocrómicos, se han observado cambios de color significativos, especialmente, en condiciones *in vitro*, donde se observan claramente cambios progresivos de color durante todos los tiempos de medida. En relación con la validación en condiciones *in vivo*, cabe

V. Conclusiones y líneas futuras

resaltar los cambios de color observados en la película Zeína_4,5eno, los cuales se producen durante los ocho días de duración del ensayo.

Con respecto al estudio de biodegradabilidad de los films halocrómicos, el aumento en la concentración de enocianinas supone una menor velocidad de degradación. También cabe destacar que, debido a la fragilidad de las películas, no se ha podido obtener el % de degradación de cada muestra extraída. A pesar de ello, se ha alcanzado la desintegración total de, prácticamente, todas las formulaciones desarrolladas en un período máximo de 4 semanas.

Finalmente, cabe destacar que se han desarrollado películas indicadoras de pH aplicables para la monitorización de la frescura de alimentos frescos, fabricadas a base de recursos renovables, y que han presentado una gran capacidad de degradación, por lo que su impacto ambiental generado una vez desechadas es muy inferior al generado por los materiales poliméricos de origen petroquímico.

V.2. Líneas futuras.

Como líneas futuras de investigación aplicadas al presente trabajo, se podría considerar la opción de mejorar la estabilidad de las enocianinas en la matriz polimérica mediante, por ejemplo, la aplicación de recubrimientos. También se podría considerar la opción de aplicar antioxidantes y estabilizadores UV que protejan a los componentes halocrómicos de la degradación oxidativa y de la radiación UV, respectivamente, siempre y cuando no interfieran en la respuesta halocrómica.

Con respecto a la caracterización, se podría considerar la opción de implementar nuevas técnicas de ensayo y caracterización que permitan determinar las capacidades antioxidantes y antibacterianas de las películas o, incluso, realizar estudios de envejecimiento acelerado para evaluar la estabilidad de la película halocrómica durante el almacenamiento y evaluar la durabilidad de la respuesta halocrómica bajo condiciones de uso repetido.

V. Conclusiones y líneas futuras

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Referencias

1. Napper, I.E. and R.C. Thompson, *Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges*. *Global Challenges*, 2020. **4**(6), 1900081.
2. Filiciotto, L. and G. Rothenberg, *Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts*. *Chemsuschem*, 2021. **14**(1): p. 56-72.
3. Huang, J.J., et al., *Chemical recycling of plastic waste for sustainable material management: A prospective review on catalysts and processes*. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2022. **154**, 111866.
4. Kumar, M., et al., *Current research trends on micro- and nano-plastics as an emerging threat to global environment: A review*. *Journal of Hazardous Materials*, 2021. **409**, 124967.
5. Kumar, R., et al., *Impacts of Plastic Pollution on Ecosystem Services, Sustainable Development Goals, and Need to Focus on Circular Economy and Policy Interventions*. *Sustainability*, 2021. **13**(17), 9963.
6. Chia, W.Y., et al., *Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production*. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2020. **4**, 100065.
7. Liu, L.C., et al., *On the degradation of (micro)plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts*. *Science of the Total Environment*, 2022. **806**, 151312.
8. Kalita, N.K. and M. Hakkarainen, *Integrating biodegradable polyesters in a circular economy*. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2023. **40**, 100751.
9. Siracusa, V. and I. Blanco, *Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent Developments in Bio-Based Polymers Analogous to Petroleum-Derived Ones for Packaging and Engineering Applications*. 2020. **12**(8): p. 1641.
10. Chen, L.Y., R.E.O. Pelton, and T.M. Smith, *Comparative life cycle assessment of fossil and bio-based polyethylene terephthalate (PET) bottles*. *Journal of Cleaner Production*, 2016. **137**: p. 667-676.
11. Baldwin, A.D. and K.L. Kiick, *Polysaccharide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials*. *Biopolymers*, 2010. **94**(1): p. 128-140.
12. Shen, L. and M.K. Patel, *Life Cycle Assessment of Polysaccharide Materials: A Review*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2008. **16**(2): p. 154-167.
13. Wang, Y., J. Yin, and G.Q. Chen, *Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014. **30**: p. 59-65.
14. Tian, H.F., et al., *Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018. **120**: p. 475-490.
15. Ncube, L.K., et al., *An Overview of Plastic Waste Generation and Management in Food Packaging Industries*. *Recycling*, 2021. **6**(1), p. 12.
16. Cheng, J., et al., *Applications of biodegradable materials in food packaging: A review*. *Alexandria Engineering Journal*, 2024. **91**: p. 70-83.
17. Wang, Y.X., et al., *Sustainable polysaccharide-based materials for intelligent packaging*. *Carbohydrate Polymers*, 2023. **313**, 120851.
18. Alizadeh-Sani, M., et al., *pH-sensitive (halochromic) smart packaging films based on natural food colorants for the monitoring of food quality and safety*. *Trends in Food Science & Technology*, 2020. **105**: p. 93-144.

Referencias

19. Sani, M.A., et al., *Recent Advances in the Development of Smart and Active Biodegradable Packaging Materials*. *Nanomaterials*, 2021. **11**(5), 1331.
20. Chen, C., et al., *Biodegradable and recyclable bio-based laminated films of poly (lactic acid) and cellulose nanocrystals for food barrier packaging*. *Food Packaging and Shelf Life*, 2024. **42**, 101244.
21. Yao, Q.B., et al., *Polysaccharide-based food packaging and intelligent packaging applications: A comprehensive review*. *Trends in Food Science & Technology*, 2024. **147**, 104390.
22. Sharaby, M.R., E.A. Soliman, and R. Khalil, *Halochromic smart packaging film based on montmorillonite/polyvinyl alcohol-high amylose starch nanocomposite for monitoring chicken meat freshness*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. **258**, 128910.
23. Hashim, S.B.H., et al., *Smart films of carbohydrate-based/sunflower wax/purple Chinese cabbage anthocyanins: A biomarker of chicken freshness*. *Food Chemistry*, 2023. **399**, 133824.
24. Priyadarshi, R., P. Ezati, and J.W. Rhim, *Recent Advances in Intelligent Food Packaging Applications Using Natural Food Colorants*. *ACS Food Science & Technology*, 2021. **1**(2): p. 124-138.
25. Firouz, M.S., K. Mohi-Alden, and M. Omid, *A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development*. *Food Research International*, 2021. **141**, 110113.
26. Sobhan, A., K. Muthukumarappan, and L. Wei, *A biopolymer-based pH indicator film for visually monitoring beef and fish spoilage*. *Food Bioscience*, 2022. **46**, 101523.
27. Puttipan, R. and S. Khankaew, *Novel bio-based, time-temperature dependent colorimetric ink and film containing colorants from the red pitaya (*Hylocereus costaricensis*)*. *Progress in Organic Coatings*, 2023. **178**, 107470.
28. Drago, E., et al., *Innovations in Smart Packaging Concepts for Food: An Extensive Review*. *Foods*, 2020. **9**(11), 1628.
29. Vilela, C., et al., *Antimicrobial and Conductive Nanocellulose-Based Films for Active and Intelligent Food Packaging*. *Nanomaterials*, 2019. **9**(7), 980.
30. Alias, S.A., et al., *Halochromic PLA/PEG as real-time solution and vapor sensing*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2022. **139**(20), 52159.
31. Aghaei, Z., et al., *Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness*. *Food Control*, 2020. **111**, 107065.
32. Yildiz, E., G. Sumnu, and L.N. Kahyaoglu, *Monitoring freshness of chicken breast by using natural halochromic curcumin loaded chitosan/PEO nanofibers as an intelligent package*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021. **170**: p. 437-446.
33. Lyu, J.S., et al., *Development of a BTB-/TBA+ ion-paired dye-based CO₂ indicator and its application in a multilayered intelligent packaging system*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2019. **282**: p. 359-365.
34. Liu, X.Y., et al., *An on-package colorimetric sensing label based on a sol-gel matrix for fish freshness monitoring*. *Food Chemistry*, 2020. **307**, 125580.
35. Upadhyay, A., et al., *Bio-based smart packaging: Fundamentals and functions in sustainable food systems*. *Trends in Food Science & Technology*, 2024. **145**, 104369.

Referencias

36. Alizadeh-Sani, M., et al., *Multifunctional halochromic packaging materials: Saffron petal anthocyanin loaded-chitosan nanofiber/methyl cellulose matrices*. *Food Hydrocolloids*, 2021. **111**, 106237.
37. Chen, H.Z., et al., *Novel pH-sensitive films containing curcumin and anthocyanins to monitor fish freshness*. *Food Hydrocolloids*, 2020. **100**, 105438.
38. Liu, Y.W., et al., *Fabrication and characterization of pH-responsive intelligent films based on carboxymethyl cellulose and gelatin/curcumin/chitosan hybrid microcapsules for pork quality monitoring*. *Food Hydrocolloids*, 2022. **124**, 107224.
39. Guillén, M.V.L., *Estructura y propiedades de las proteínas*. 2009.
40. Jaski, A.C., et al., *Zein - a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses*. *Industrial Crops and Products*, 2022. **186**, 115250.
41. Hadidi, M., et al., *Plant protein-based food packaging films; recent advances in fabrication, characterization, and applications*. *Trends in Food Science & Technology*, 2022. **120**: p. 154-173.
42. Yi, F.X., et al., *Preparation, characterization and application of pH-responsive smart film based on chitosan/zein and red radish anthocyanin*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023. **253**, 127037.
43. Xavier, L.O., et al., *Chitosan packaging functionalized with Cinnamodendron dinisii essential oil loaded zein: A proposal for meat conservation*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021. **169**: p. 183-193.
44. Rojas-Lema, S., et al., *"Faba bean protein films reinforced with cellulose nanocrystals as edible food packaging material"*. *Food Hydrocolloids*, 2021. **121**, 107019.
45. Jiang, G.Y., et al., *Preparation and characterization of indicator films from carboxymethyl-cellulose/starch and purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam) anthocyanins for monitoring fish freshness*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. **143**: p. 359-372.
46. Zhang, K.L., et al., *Novel pH-sensitive films based on starch/polyvinyl alcohol and food anthocyanins as a visual indicator of shrimp deterioration*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. **145**: p. 768-776.
47. Thakur, R., et al., *Effect of anthocyanin-natural deep eutectic solvent (lactic acid/fructose) on mechanical, thermal, barrier, and pH-sensitive properties of polyvinyl alcohol based edible films*. *Food Packaging and Shelf Life*, 2022. **33**, 100914.
48. Sessa, D.J., et al., *Melt-processed blends of zein with polyvinylpyrrolidone*. *Industrial Crops and Products*, 2011. **33**(1): p. 57-62.
49. Bouman, J., et al., *The Development of Direct Extrusion-Injection Moulded Zein Matrices as Novel Oral Controlled Drug Delivery Systems*. *Pharmaceutical Research*, 2015. **32**(8): p. 2775-2786.
50. Ghorbani, M., et al., *A halochromic indicator based on polylactic acid and anthocyanins for visual freshness monitoring of minced meat, chicken fillet, shrimp, and fish roe*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2021. **74**, 102864.
51. Nogueira, G.F., et al., *Multipurpose arrowroot starch films with anthocyanin-rich grape pomace extract: Color migration for food simulants and monitoring the freshness of fish meat*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024. **265**, 130934.
52. Jiang, L.W., et al., *Development of zein edible films containing different catechin/cyclodextrin metal-organic frameworks: Physicochemical characterization,*

Referencias

antioxidant stability and release behavior. Lwt-Food Science and Technology, 2023.
173, 114306.

MATERIAL SUPPLEMENTARIO

MATERIAL

SUPPLEMENTARIO

Material suplementario

Caracterización mecánica: ensayo de tracción

A continuación, se muestran los gráficos de tensión-deformación unitaria obtenidos en el ensayo de tracción, a partir de los cuales se han determinado las propiedades mecánicas de las películas.

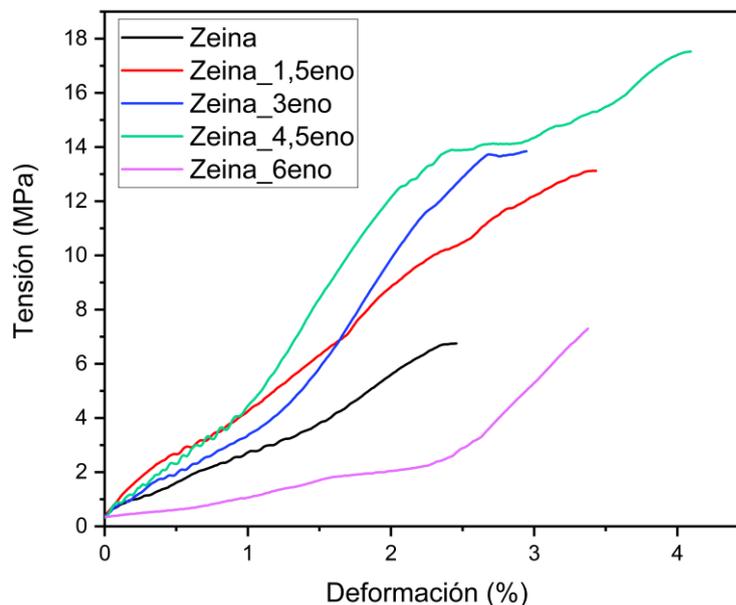


Figura 46. Gráfico tensión-deformación unitaria de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

Caracterización térmica: calorimetría diferencial de barrido (DSC)

A continuación, se muestran las curvas calorimétricas correspondientes a los cinco films halocrómicos desarrollados. A simple vista, no se aprecia ninguna transición térmica que proporcionen información relevante sobre las propiedades térmicas de los films. Por este motivo, se ha realizado un gráfico con un rango de temperatura inferior (0 -120 °C) con el que se ha podido determinar con mayor claridad los saltos de las líneas base correspondientes a las temperaturas de transición vítrea de los films analizados y como varía esta con la adición de distintas concentraciones de enocianinas.

Material suplementario

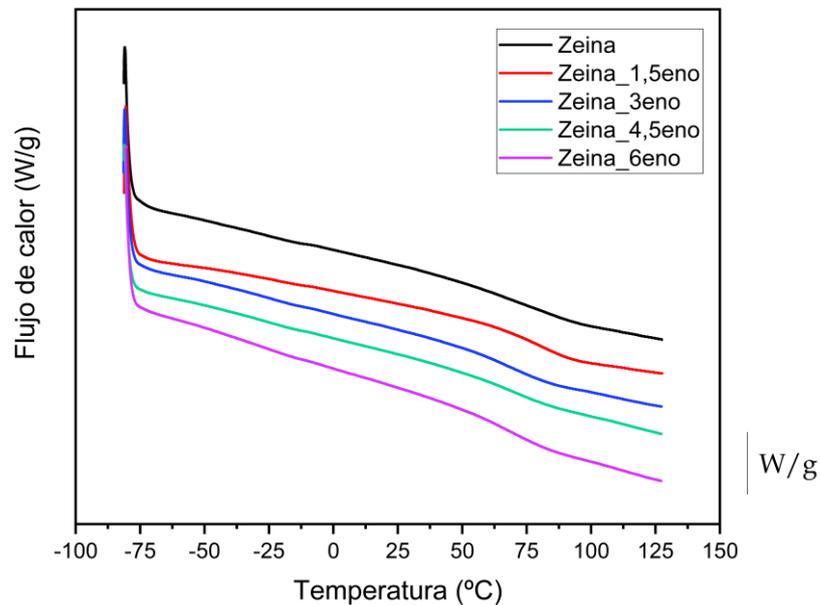


Figura 47. Curvas calorimétricas completas de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.

Caracterización superficial: goniometría óptica

A continuación, se muestran las imágenes correspondientes a los ensayos de goniometría óptica, a partir de las cuales se han determinado los ángulos de contacto para cada película.

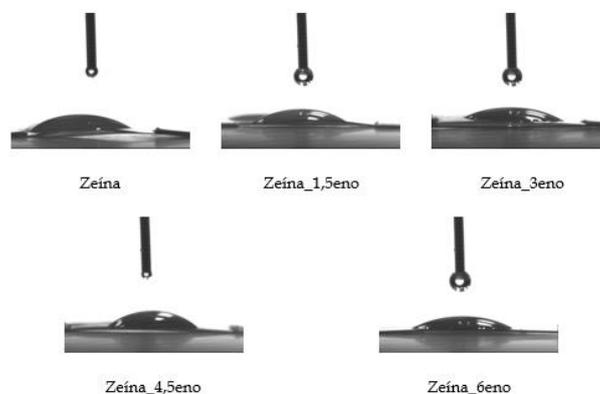


Figura 48. Imágenes de los ángulos de contacto de las películas de zeína con distintas composiciones de enocianinas.