

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE TECNOLOGIA D'ALIMENTS
INSTITUT UNIVERSITARI D'ENGINYERIA D'ALIMENTS
PER AL DESENVOLUPAMENT



**CARACTERITZACIÓ DE
RECOBRIMENTS COMESTIBLES A
BASE DE QUITOSÀ I PROPOLIS**

MÀSTER EN CIÈNCIA I ENGINYERIA DELS ALIMENTS

E.T.S.I.A.M.N.

ANNA VICENT OLTRA

CARACTERITZACIÓ DE RECOBRIMENTS COMESTIBLES A BASE DE QUITOSÀ I PROPOLIS

Vicent, A., Pastor, C., Chiralt, A., González-Martínez, C., Cháfer, M.*

RESUM

En aquest treball s'analitzen les propietats reològiques, densitat, tamany de partícula i potencial- ζ de quatre formulacions a base de quitosà i propolis, així com les propietats òptiques, mecàniques i microestructurals, la permeabilitat al vapor d'aigua i a l'oxigen dels films formats a partir de les mateixes formulacions. Dels anàlisis obtinguts s'observa que la incorporació de l'extracte de propolis modifica totes les propietats que confereix la matriu de quitosà pura. En termes de propietats reològiques i densitat, l'extracte aquós de propolis augmentà la densitat i disminuï la viscositat aparent. El tamany de partícula es va fer evident en les formulacions amb l'extracte de propolis, ja que en el cas del quitosà pur no hi havia partícules al trobar-se aquest totalment dissolt, i el potencial- ζ va disminuir per l'addició de càrregues negatives al sistema. En quant als films, els resultats de les propietats òptiques foren molt variats, posat que cada component aporta unes característiques, sent el més destacable el canvi de coloració cap a tonalitats pardenques-rogenques. Les propietats mecàniques no experimentaren grans canvis, ja que el principal responsable en aquest cas fou el glicerol, els components del propolis sols comportaren augments en la rigidesa dels films, la qual es veié atenuada per la presència de l'oleic. La permeabilitat al vapor d'aigua va disminuir en les formulacions preparades amb l'extracte aquós de propolis, mentre que la de l'oxigen es va incrementar en les que contien oleic, però no en la de l'extracte aquós de propolis pur. Per últim s'observà l'aparència al SEM, el qual va corroborar les hipòtesis de que l'estructura formada pel quitosà amb l'extracte aquós de propolis era responsable directa dels canvis en totes les propietats.

PARAULES CLAU: QUITOSÀ, PROPOLIS, FILMS, PROPIETATS FISICOQUÍMIQUES

RESUMEN

En este trabajo se analizan las propiedades reológicas, densidad, tamaño de partícula y potencial- ζ de cuatro formulaciones a base de quitosano y propóleo, así como las propiedades ópticas, mecánicas i microestructurales, la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno de los films formados a partir de dichas formulaciones. De los análisis obtenidos se observa que la incorporación del extracto de propóleo modifica todas las propiedades que confiere la matriz de quitosano pura. En términos de propiedades reológicas y densidad, el extracto acuoso de propóleo aumentó la densidad y disminuyó la viscosidad aparente. El tamaño de partícula se hizo evidente en las formulaciones con el extracto de propóleo, ya que en el caso del quitosano

puro no hay partículas al encontrarse éste totalmente disuelto, y el potencial- ζ disminuyó por la adición de cargas negativas al sistema. En cuanto a los films, los resultados de las propiedades ópticas fueron muy variados, puesto que cada componente aporta unas características, siendo lo más destacable el cambio de coloración hacia tonos pardos-rojizos. Las propiedades mecánicas no experimentaron grandes cambios, ya que el principal responsable en este caso fue el glicerol, los componentes del propóleo solamente conllevaron aumentos en la rigidez de los films, que se vio atenuada por la presencia del oleico. La permeabilidad al vapor de agua disminuyó en las formulaciones hechas con extracto acuoso de propóleo, mientras que la del oxígeno se incrementó en los que contenían oleico, pero no en la del extracto acuoso de propóleo puro. Por último se observó la apariencia al SEM, lo cual corroboró las hipótesis de que la estructura formada por el quitosano con el extracto acuoso de propóleo era responsable directa de los cambios en todas las propiedades.

PALABRAS CLAVE: QUITOSANO, PROPOLEO, FILMS, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

ABSTRACT

In this work the rheological properties, density, size of particle and potential- ζ of four formulations based on chitosan and propolis, as well as the optical, mechanical and microstructural properties, water vapor and oxygen permeability of the films formed from the above mentioned formulations were analyzed. From the analysis obtained it shows that the addition of propolis extract modify all the properties that pure chitosan matrix confers. In terms of rheological properties and density, the aqueous extract of propolis increased density and decreased the apparent viscosity. The particle size was evident in the formulations with the extract of propolis, as in the case of pure chitosan there are no particles when it's totally dissolved, and the ζ -potential decreased by the addition of negative charges into the system. As for the films, the results of the optical properties were very varied, since every component contributes a few characteristics, the most notable being the change of color to reddish-brown tones. The mechanical properties did not experience major changes, since the principal responsible in this case was glycerol, propolis components only carried increases the stiffness of the films, which was attenuated by the presence of oleic acid. The water vapor permeability decreased in the formulations made with aqueous extract of propolis, while that of oxygen increased in the oleic acid containing, but not on the pure aqueous extract of propolis. Finally the appearance was observed to SEM, which corroborated the hypothesis that the structure formed by the chitosan with the aqueous extract of propolis was directly responsible for changes in all properties.

KEY WORDS: CHITOSAN, PROPOLIS, FILMS, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

1. INTRODUCCIÓ

Un dels problemes més importants en el comerç de la fruita és que la seua vida útil és molt curta degut fonamentalment a què la seua activitat metabòlica continua després de la seua recol·lecció. El control d'aquesta activitat, a més de la pèrdua d'aigua i atac microbiològic, seran factors clau a tindre en compte per a intentar reduir les principals pèrdues postcollita i allargar la vida de mercat dels fruits.

En aquest sentit, l'aplicació de pel·lícules i recobriments comestibles als aliments representa un nou enfocament per a resoldre aquest problema. Els films i recobriments comestibles actuen com a barreres semipermeables que poden ser capaços de mantenir la qualitat dels aliments, i al ser materials biodegradables, ofereixen sistemes alternatius d'envasat que redueixen els danys mediambientals. Les pel·lícules i recobriments comestibles poden estar formades pels tres tipus de matrius biològiques: polisacàrids, proteïnes i lípids. En general, per la seua naturalesa hidrofílica, les matrius de polisacàrids exhibeixen una bona barrera als gasos però una baixa capacitat barrera al vapor d'aigua que caldrà millorar en el disseny de les formulacions per a fruita.

Les tendències actuals enfoquen l'atenció al desenvolupament i ús de pel·lícules amb propietats antimicrobianes per a millorar la vida útil i la seguretat alimentària. Biomolècules actives, com ara el quitosà i els seus derivats han guanyat importància en l'àrea d'aplicació alimentària a la vista dels recents brots de contaminació associats a productes alimentaris, així com la creixent preocupació per l'impacte mediambiental conseqüència dels materials amb què es fabriquen els envasos.

El quitosà té un gran potencial per a ser usat en una ampla gamma d'aplicacions degut a la seua biodegradabilitat, biocompatibilitat, activitat antimicrobiana, no toxicitat i versatilitat en les seues propietats físico-químiques, raó per la qual els recobriments a base de quitosà han demostrat ser molt eficaços en la conservació d'aliments (Dutta *et al.*, 2009). Aquest compost antimicrobià natural es pot obtenir a partir de les closques de crustacis mitjançant processos químics o microbiològics, o bé pot ser produït per alguns fongs (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*). El quitosà ha guanyat recentment un gran interès per les seues aplicacions en el camp de l'alimentació i farmàcia. Entre d'altres, l'activitat antimicrobiana ha segut assenyalada com una de les seues propietats més interessants (Devlieghere *et al.*, 2004).

Per un altra banda, el propolis és un producte resinós natural produït per les abelles a partir de gemmes i fulles d'arbres i plantes. En general, conté un 50% de resines (formades de flavonoids, àcids fenòlics i els seus esters), 30% de ceres, 10% d'olis essencials, 5% de pol·len i 5% de diversos compostos orgànics com ferro i zinc, vitamines del grup B (B₁, B₂, B₃ i B₆), àcid benzoic, àcids grassos, esters, cetones, lactones, quinones, esteroides, sucres i alguns pigments com ara la clorofil·la i els carotenoids (Farré *et al.*, 2004; Juliano *et al.*, 2007). A més, la majoria dels components del propolis són compostos naturals dels aliments, i per tant estan reconeguts com a substàncies segures i/o additius alimentaris o compostos GRAS. D'altra

banda, el propolis és cada vegada més reconegut per les seues propietats antibacterianes i antifúngiques, i se sap que els fenols simples, els àcids fenòlics i els polifenols actuen com a agents antimicrobians actius, de la mateixa manera que els derivats de l'àcid gàl·lic han demostrat efectes inhibitoris contra bacteries Gram-positives i Gram-negatives (Tosi *et al.*, 2007). L'acció contra els microorganismes és una característica essencial del propolis que ve sent utilitzada pels humans des de fa segles. El propolis ha segut utilitzat com a medicina popular a Europa, i al Japó el consumeixen com a aliment saludable; a més, els japonesos creuen que pot tenir acció curativa d'inflamacions, malalties del cor i fins i tot contra diabetis i càncer (Nagai *et al.*, 2003).

Les propietats antioxidants, antibacterianes i antifúngiques, combinat amb el fet que diversos dels seus components estan presents en additius alimentaris i/o aliments i són reconeguts com a GRAS, fan del propolis un atractiu candidat com a conservant natural en noves aplicacions per a aliments, absents de conservants tradicionals o a concentracions molt baixes (Kalogeropoulos *et al.*, 2009). Malgrat el gran interès del seu ús en la indústria alimentària, són pocs el estudis sobre la incorporació d'aquest compost a recobriments comestibles i quina seria la forma d'extracció més pertinent per a aquest tipus d'aplicacions. Segons uns estudis realitzats per Pastor *et al.* (2010; 2011) els quals van caracteritzar formulacions a base d'un extracte etanòlic de propolis (EEP) i les van aplicar a raïm, es va concloure la idoneïtat d'aquest extracte per tal de formar recobriments eficaços per a fruites. La caracterització dels films aïllats va mostrar que, la incorporació de l'EEP a matrius de polisacàrids (hidroxipropil meticel·lulosa) redueix significativament la permeabilitat al vapor d'aigua (PVA) i els films augmenten la seua resistència mecànica i rigidesa, en relació als films purs (sols a base d'hidroxipropil meticel·lulosa). A més a més, els films amb EEP van mostrar una notable activitat antifúngica contra *A. niger* i *Penicillium italicum*. Quant a l'aplicació a raïm els recobriments amb EEP van controlar la pèrdua de pes i el pardejament i van millorar la luentor i la qualitat microbiològica. Donat que aquest extracte va resultar prou eficaç, el que es pretén en aquest treball es trobar noves formes d'extracció i incorporació del propolis als recobriments, i com estos afectaran a les seues propietats fisicoquímiques, tant en films aïllats com en possibles aplicacions.

L'objectiu d'aquest estudi consisteix en dissenyar noves formes d'extracció del propolis (oliosa i aquosa) i caracteritzar els extractes de propolis així obtesos en quant a algunes propietats fisicoquímiques, i caracteritzar els films secs en base a la microestructura, permeabilitat al vapor d'aigua i a l'oxigen i a les propietats mecàniques i òptiques.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. Preparació de les formulacions formadores de recobriment

Les formulacions formadores de recobriments (FFRs) es van preparar utilitzant com a matriu suport quitosà (Q) de pes molecular mitjà (Sigma-

Aldrich Química S.A., Madrid, España). Per a obtenir l'extracte aquós (EAP) i l'extracte oliós (EOP) de propolis, el propolis cru (Bonamel Orgànic S.L., Alqueria d'Asnar, Espanya) es va triturar amb una picadora per tal que quedara el més disgregat possible. A continuació, el propolis cru triturat es va macerar amb aigua u oli en una relació 1:10 durant 4 dies amb agitació constant i en un lloc obscur a temperatura ambient. Posteriorment els dos extractes es van filtrar a buit per tal d'eliminar els sediments insolubles.

Aleshores, el quitosà es va dissoldre amb aigua destil·lada o amb l'EAP de manera que, per a preparar 100 g d'una FFR a l'aigua o a l'EAP s'afegeix 1 g de quitosà i 0,25 mL d'àcid acètic (AA). Les FFRs es deixen agitant-se durant 4 hores per a què tot el contingut quede dissolt. Una vegada dissoltes, es van afegir 0,5 mL de glicerol, i per a aquelles FFRs que ho van requerir, es va afegir 1 g d'àcid oleic (AO) o 1g de l'EOP i s'homogeneïtzaren amb un ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemanya) a 13500 rpm durant 4 minuts. Seguidament es desairegen en un dessecador a buit fins eliminar tot l'aire.

Les FFRs estandaritzades per a 100 g de dissolució es prepararen com es detalla a la taula 2.1.

TAULA 2.1. Composició de les formulacions formadores de recobriments (FFRs)

FFR	Q (g)	AA (μ L)	Glicerol (g)	AO (g)	EOP (g)
Q	1	250	0,5	-	-
Q _{EAP}	1	250	0,5	-	-
Q _{EAP+AO}	1	250	0,5	1	-
Q _{EAP+EOP}	1	250	0,5	-	1

2.2. Propietats fisicoquímiques de les formulacions formadores de recobriments

2.2.1. DENSITAT

La densitat es va determinar per triplicat a 25°C amb un densímetre (DA-110M, Mettler Toledo, Espanya).

2.2.2. PROPIETATS REOLÒGIQUES

Per a la prova de reologia s'utilitzà un reòmetre rotatori amb un sensor del tipus Z34DIN Ti (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemanya). L'anàlisi es va fer per triplicat, mesurant l'esforç tallant (σ) en funció del gradient de velocitat ($\dot{\gamma}$), des de 0 a 512 s⁻¹ de la següent forma: 300 s fins alçar el $\dot{\gamma}$ màxim i 300 s de descens fins al 0. Per a l'anàlisi de les dades s'usà el programa *RheoWin 3* junt a l'excel, que ens permeten obtenir les corbes de flux que s'ajusten amb el model d'Ostwald de Waele o Llei de la Potència, mitjançant el qual es determina l'índex de comportament

al flux (n) i l'índex de consistència (K) de les FFRs. La viscositat aparent es calculà a 100 s^{-1} .

2.2.3. TAMANY DE PARTÍCULA

El tamany de partícula es va determinar per triplicat a 25°C amb un difractòmetre làser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Regne Unit). Cada mostra es dispersà amb aigua destil·lada a 1900 rpm fins que es va obtenir un nivell d'obscuració del 8%. Per a facilitar la dissolució es va aplicar un nivell 4 d'ultrasons. Per a l'aplicació de la teoria Mie es tingué en compte un índex de refracció d'un 1,5, i una absorció de 0,01 per a les partícules disperses. El tamany mig de partícula es calculà a partir dels paràmetres d_{32} i d_{34} .

2.2.4. POTENCIAL- ζ

La determinació d'aquest paràmetre es basa en la mobilitat electroforètica de les partícules realitzada en un equip Zetasizer (Nano-Z, Malvern Instruments, Regne Unit). Les FFRs foren diluïdes amb aigua bidestil·lada fins una concentració final del 0,02% (base lliure de glicerol) abans de cada anàlisi. Per a la conversió de les dades de mobilitat electroforètica en valors de potencial- ζ s'utilitzà el model de Smoluchowsky.

2.3. Formació dels films

Per a l'obtenció dels films, es verteixen les FFRs en plaques anivellades de politetrafluoretilé (PTFE) de 15 cm de diàmetre, cadascuna fins un determinat pes per a assegurar la mateixa quantitat de sòlids totals per placa (0,9896 g sòlids totals tenint en compte que les plaques tenen un àrea de $1,7672 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$ i la densitat de sòlids és de 56 g/m^2).

Les plaques es posen a assecat en una cambra amb temperatura i humitat controlades de 25°C i 50% respectivament fins que s'evapore l'aigua i quede el film sec. Una vegada secs, els films són equilibrats a 25°C en un dessecador que conté una sal saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ per a obtenir una humitat del 53%.

2.4. Caracterització dels films

2.4.1. PROPIETATS ÒPTIQUES

Brillantor

La brillantor és un paràmetre que ens informa de la llum que reflexa un cos, fa referència a la claredat o obscuritat d'un color, i varia segons el fons sobre el que es mesure, blanc o negre. Aquesta propietat fou mesurada amb un brillòmetre pla (Multi-Gloss 268, Minolta Co., Japó), a 60° d'angle d'incidència perpendicularment a la superfície del film, d'acord amb l'estàndard D523 de la ASTM (1999). Les mesures es feren per quintuplicat i

sobre tres llocs de cada mostra. Els resultats s'expressen en unitats de lluentor, en relació a una superfície estàndard negra amb un valor de lluentor pròxim a 100.

Translucidesa i color

Les mesures d'aquestes dos qualitats es feren per quintuplicat mitjançant un espectrecolorímetre (CM-3600d, Minolta Co., Japó) amb una àrea de mesura de 10 mm, que mesura l'espectre de reflexió de les mostres. Les mesures es van fer al centre de cada film i sobre fons blanc i negre.

La translucidesa, calculada a través de la transmitància interna (T_i) foren determinades aplicant la teoria de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) segons les equacions 1-5.

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2 \cdot R_\infty} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$R_\infty = a - b \quad (\text{Ec. 2})$$

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$T_i^2 = (a - R_0)^2 - b^2 \quad (\text{Ec. 5})$$

A partir de l'espectre de reflexió s'obtenen les coordenades CIEL*a*b (Ec. 6-8) utilitzant com a sistema de referència l'il·luminant D65/observador 10°. I a partir de les coordenades L*a*b es calcula la tonalitat (Ec. 9), el cromà (Ec. 10) i l'índex de blancor (Ec. 11).

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$a^* = 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 7})$$

$$b^* = 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 8})$$

$$h^*_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 9})$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2} \quad (\text{Ec. 11})$$

2.4.2. PROPIETATS MECÀNIQUES

L'anàlisi es realitza utilitzant una premsa mecànica (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Regne Unit), amb una cèl·lula de càrrega de 50 Kg i pinces de tensió (A/TG). Les mostres, de 25,4 x 10 mm, es col·loquen deixant una separació entre les pinces de 50 mm, i l'assaig es va fer a una velocitat de 50 mm/min (ASTM, 2001). L'anàlisi de cada formulació es va fer per quintuplicat, i els paràmetres obtinguts foren l'esforç en el punt de fractura (σ_F), el percentatge d'elongació (%E) i el mòdul d'elasticitat (ME), calculats segons les equacions 12 i 13.

$$\sigma = \frac{F \cdot (L_0 + L_t)}{A_0 \cdot L_0} \quad (\text{Ec. 12})$$

$$\varepsilon_H = \text{Ln} \frac{L_0 + L_t}{L_0} \quad (\text{Ec. 13})$$

on,

σ , esforç, Pa

F, força, N

L_t , longitud del film a temps t, m

L_0 , longitud inicial del film, m

A_0 , àrea transversal inicial del film, m²

ε_H , deformació de Henck

2.4.3. PERMEABILITAT AL VAPOR D'AIGUA

Amb aquest paràmetre es mesura la capacitat d'un cos per deixar passar l'aigua. Una alta permeabilitat és indicatiu de què el material deixa passar molta aigua. Que es desitge o no aquesta propietat dependrà de la funció que vaja a realitzar el material. Per a la seua mesura s'utilitza una modificació de la tècnica gravimètrica ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993), fent ús de copes d'alumini (fabricades per Monje Hnos, S.L., Valencia, Espanya) i tenint en compte la correcció del mètode suggerida per Gennadios *et al.* (1994). L'anàlisi es fa a una temperatura controlada de 25°C i en presència d'una dissolució saturada de Mg(NO₃)₂.

2.4.4. PERMEABILITAT A L'OXIGEN

La permeabilitat a l'oxigen és un paràmetre que informa de la capacitat d'un material a deixar passar l'oxigen. Similar a la permeabilitat al vapor d'aigua, aquesta propietat serà requerida en determinats casos, mentre que no serà desitjada en altres. Per al seu estudi, es fa ús d'un equip de permeabilitat a l'oxigen (OX-TRAN 1/50, Mocon, Minneapolis, USA), que treballa de manera autònoma proporcionant el valor de permeabilitat de la mostra introduïda una volta fixats els paràmetres amb què es vol treballar.

2.4.5. ANÀLISI MICROSTRUCTURAL

L'anàlisi microstructural de la superfície dels recobriments es va fer amb un microscopi electrònic d'escandallatge (JEOL JSM-5410, Oxford Instruments, Regne Unit) dotat d'un sistema d'observació de mostres criofixades (CT1500C) del Servei de Microscopia Electrònica de la Universitat Politècnica de València. Per a l'estudi es prepararen mostres de 5 x 1 mm que foren col·locades en un portaobjectes de coure. Posteriorment es va fer un metal·litzat amb or i finalment observació a 20 kV.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. Propietats fisicoquímiques de les formulacions formadores de recobriments

3.1.1. DENSITAT, TAMANY DE PARTÍCULA I POTENCIAL- ζ

A la taula 3.1 es poden observar els valors de les mitges i desviacions estàndard obtinguts de l'anàlisi estadístic (ANOVA) corresponents a la densitat, tamany de partícula (d_{43} i d_{32}) i potencial- ζ . Les dades ens mostren que existeixen diferències significatives entre formulacions ($p < 0,05$).

La densitat augmenta amb l'addició de l'extracte aquós, i disminueix amb la incorporació de la fracció lipídica, el que és coherent per la seua menor densitat. En quant al tamany de partícula, la incorporació de l'EAP dona lloc a agregats orgànics amb un tamany mig de 64 micres. La incorporació de la fracció lipídica genera tamanyos majors de partícula, que disminueixen quan s'incorpora propolis al mateix. Esta disminució podria deures a la presència de grups anfífil·lics que actuarien com a emulsionants, tal i com s'ha observat en altres treballs (Pastor *et al.*, 2010).

TAULA 3.1.- Densitat, tamany de partícula (d_{43} i d_{32}) i potencial- ζ de les formulacions formadores de recobriments (FFRs). Valors de les mitges i desviacions estàndard.

FFR	ρ (Kg/m ³)	d_{43} (μ m)	d_{32} (μ m)	Potencial- ζ (mV)
Q	1002,8 (0,2) ^a	-	-	56 (9) ^b
Q _{EAP}	1006,9 (0,2) ^d	64(14) ^a	3.8(0.8) ^a	53 (3) ^b
Q _{EAP+AO}	1005,23 (0,06) ^b	104(26) ^c	11(3) ^b	40 (2) ^a
Q _{EAP+EOP}	1005,67 (0,06) ^c	76(8) ^b	10.6(0.9) ^b	39 (1) ^a

A la figura 3.1 es pot observar la distribució de tamanyos de partícula de les formulacions preparades amb l'extracte de propolis, en funció del volum (a) i del número de partícules (b). En vista dels resultats en base al % de volum, s'aprecia que quan la FFR sols conté EAP, la distribució de la corba és bimodal amb dos tamanyos de partícula diferents (un pic a 8 micres i altre a 100 micres). La incorporació de l'àcid oleic a les formulacions canvia aquest comportament, i fa que la corba tinga una distribució monomodal amb

partícules de gran tamany (prop de 100 micres) i una cua molt accentuada cap a partícules més xicotetes. Per altra banda, la figura b posa de manifest que la majoria de les partícules son de xicotet tamany en totes les formulacions.

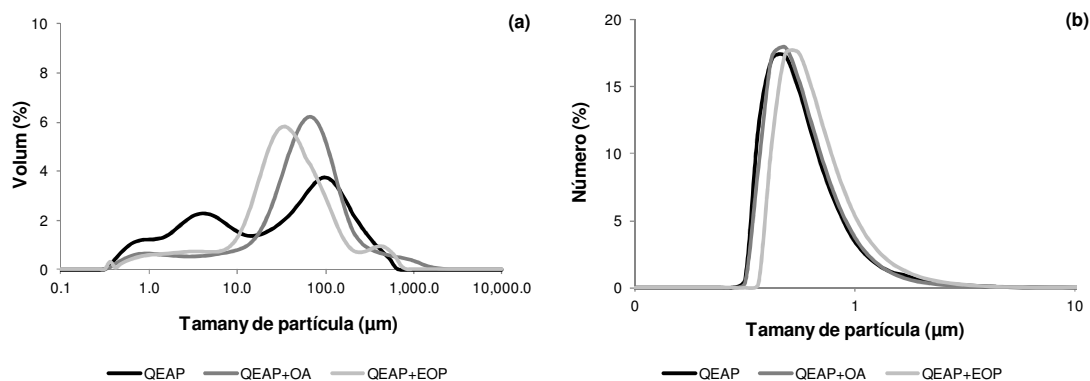


FIGURA 3.1- Distribució de tamany de partícula de les formulacions formadores de recobriment en funció del percentatge de volum (a) i de número de partícules (b).

En el potencial- ζ (Taula 3.1) també s'observen dos grups, relacionats amb la presència o no de la fracció lipídica que conté àcid oleic. Els valors de potencial del quitosà pur són de l'ordre dels descrits per Vargas *et al.* (2009). La càrrega positiva del quitosà en aquestes dissolucions és deguda als seus grups amino al pH de la dissolució (pH proper a 5). La càrrega positiva disminueix significativament al incorporar la fracció lipídica d'àcid oleic, tal i com ho ha descrit Vargas *et al.* (2009) en estudis previs. Açò és deu a la presència d'interaccions electrostàtiques entre els grups negatius de les gotes d'àcid oleic i els grups positius del quitosà. A aquest pH (5), el grup amino pot interaccionar amb el grup carboxil de l'AO (pK_a COOH/COO⁻ \approx 4.8), que es troba carregat negativament (Ham-Pichavant *et al.*, 2005).

3.1.2. PROPIETATS REOLÒGIQUES

Les corbes de flux obtingudes foren ajustades al model d'Ostwald de Waele, a partir del qual es van calcular l'índex de comportament al flux (n) i l'índex de consistència (K), que es mostren a la taula 3.2 junt al coeficient de determinació de l'ajust (r^2) i la viscositat aparent calculada a 100 s^{-1} , i els corresponents resultats de l'anàlisi estadístic (ANOVA), on s'observa clarament la formació de dos grups en tots els paràmetres: la dissolució sense extracte de propolis i les tres formulacions que sí que el contenen.

TAULA 3.2.- Paràmetres del model d'Ostwald de Waele (n i K), viscositat aparent (η_{ap}) i coeficient de determinació (r^2) de les formulacions formadores de recobriment. Valors de les mitges i desviacions estàndard.

FFR	n	K (Pa·s) ⁿ	r^2	η_{ap} (Pa·s)
Q	0,7073 (0,0002) ^a	0,656 (0,006) ^b	0,9947	0,170 (0,002) ^b
Q _{EAP}	1,2115 (0,0006) ^b	0,0015 (0,0002) ^a	0,9837	0,0039 (0,0002) ^a
Q _{EAP+AO}	1,16 (0,02) ^b	0,0021 (0,0002) ^a	0,9849	0,0044 (0,0002) ^a
Q _{EAP+EOP}	1,177 (0,005) ^b	0,0019 (0,0002) ^a	0,9859	0,0043 (0,0002) ^a

Els valors obtesos per a la viscositat del quitosà pur coincideixen amb els obtinguts per Vargas *et al.* (2009). Com es pot veure a la taula, l'índex de comportament al flux ens mostra que la FFR de quitosà presenta un comportament pseudoplàstic, mentre que les altres tres, que contenen l'extracte de propolis, tenen un comportament lleugerament dilatant ($n > 1$), no havent en cap cas un efecte tixotròpic en les corbes de pujada i baixada. Açò demostra que la incorporació d'EAP provoca en la dissolució de quitosà pura un canvi en el comportament reològic, que passa de pseudoplàstic a dilatant. Per altra banda, l'índex de consistència (K) i la viscositat aparent (η_{ap}) de les dispersions va disminuir amb la incorporació d'EAP, independentment de l'addició d'àcid oleic. Aquesta notable reducció de la viscositat en comparació a la de la dispersió sense EAP és conseqüència d'una reordenació de les molècules al sistema. Açò pot ser explicat en termes de tamany, forma i distribució de tamany de les partícules, i per les interaccions dels components que donen lloc a diferents graus d'immobilització del solvent (Barreto *et al.*, 2003). La reducció de la viscositat podria ser explicada per les interaccions entre el polímer i els components de l'extracte de propolis, tal i com ha seguit observat per Pastor *et al.* (2010).

3.2. Caracterització dels films

3.2.1. PROPIETATS ÒPTIQUES

La transparència dels films va ser calculada a través de la transmitància interna (T_i) obtinguda de l'anàlisi de Kubelka-Munk. Augments d'aquest paràmetre correspon a films més homogenis i transparents, mentre que la seua disminució condueix a una major opacitat. La figura 3.2 ens mostra l'evolució de les corbes de distribució espectral de la transmitància interna de cadascun dels films equilibrats a 25°C i 53% d'humitat relativa.

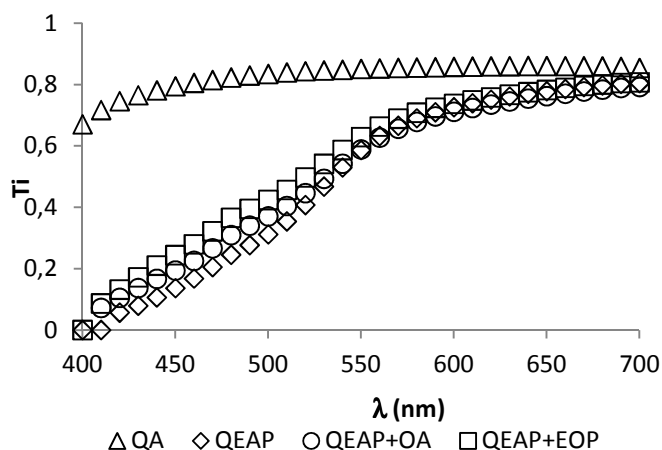


FIGURA 3.2.- Corbes de la distribució espectral de la transmissió interna (Ti) dels films equilibrats a 25°C i 53% d'humitat relativa.

Com es pot observar a la figura 3.2, els films de quitosà presenten una elevada transparència en comparació amb els que contenen l'extracte de propolis. Açò és degut al fenomen de reflexió difusa provocat per la presència d'agregats (nova fase dispersa amb diferent índex de refracció) que fan disminuir la transmissió i per tant augmenta l'opacitat dels films.

La taula 3.3. mostra les mitges i desviacions estàndard de la lluminositat, croma, tonalitat, índex de blancor, transmissió interna i brillantor a 60° dels films mesurats a 25°C i 53% d'humitat relativa. Encara que l'anàlisi estadístic ens reflexa que hi ha diferències significatives entre els films, podem dir que en general hi ha dos grups homogenis. Per una banda els films de quitosà pur, i per altra els que contenen propolis, amb independència de la presència d'àcid oleic. La incorporació de propolis als films dóna lloc a una disminució de la lluminositat, tonalitat (cap a colors pardencs-rogençs), índex de blancor i transmissió, i a un augment del croma. Tots els canvis descrits en els paràmetres de color són conseqüència de la coloració parda-rogenca que imparteix el propolis als films.

La brillantor d'un film està relacionada amb l'homogeneïtat de la superfície alcançada després del procés de secat. En les dades obtingudes s'observa que la brillantor augmenta al incorporar l'EAP, i disminueix amb l'addició d'oleic. Els canvis observats indiquen canvis en la morfologia de la superfície dels films i pareix ser que la incorporació d'EAP dóna com a resultat una superfície més homogènia i brillant. Alguns components poden replenar els buits generats en la superfície del film, donant lloc a una major reflexió especular de la llum, i per tant una major brillantor (Vargas *et al.*, 2009). Per altre costat, la presència d'oleic disminueix la brillantor a conseqüència de l'augment de la rugositat superficial, degut a la migració de les gotes cap a la superfície dels films durant el procés de secat.

TAULA 3.3.- Luminositat, croma, tonalitat, índex de blancor, transmitància interna i brillantor a 60° dels films equilibrats a 25°C i 53% d'humitat relativa. Valors de les mitges i desviacions estàndard resultat de l'anàlisi estadístic (ANOVA).

Film	L*	C* _{ab}	h* _{ab}	IB	T _i	Brillantor 60°
Q	74,2 (0,3) ^c	19,5 (0,4) ^a	88,3 (0,2) ^d	67,9 (0,8) ^d	0,835 (0,008) ^d	16 (6) ^b
Q _{EAP}	44,9 (0,6) ^a	36 (1) ^b	57 (2) ^a	34,0 (0,6) ^a	0,32 (0,02) ^a	49 (15) ^c
Q _{EAP+AO}	46,6 (0,5) ^b	36,6 (0,2) ^b	60,2 (0,5) ^b	34,9 (0,7) ^b	0,390 (0,012) ^b	16 (4) ^b
Q _{EAP+EOP}	47,2 (0,3) ^b	36,4 (0,2) ^b	61,6 (0,6) ^c	36,0 (0,4) ^c	0,417 (0,002) ^c	9 (3) ^a

3.2.2. PROPIETATS MECÀNIQUES

Els paràmetres mecànics analitzats i que es poden veure resumits a la taula 3.4 són el mòdul d'elasticitat, l'esforç de fractura i el percentatge de deformació dels films en equilibri. L'esforç de fractura representa la resistència a la deformació del film fins la seua ruptura, el percentatge de deformació mesura la capacitat d'estirament, i el mòdul d'elasticitat es relaciona amb la seua rigidesa. Els resultats mostren que hi ha diferències significatives entre formulacions en resposta a cada propietat mecànica.

TAULA 3.4.- Mòdul d'elasticitat (ME), esforç de fractura (σ_F) i percentatge de deformació (E(%)) dels films equilibrats a 25°C i 53% d'humitat relativa. Valors de les mitges i desviacions estàndard resultat de l'anàlisi estadístic (ANOVA).

Film	EM (MPa)	σ_F (MPa)	E (%)
Q	9 (3) ^a	6 (5) ^c	25 (11) ^c
Q _{EAP}	18 (4) ^b	3 (1) ^b	16 (4) ^b
Q _{EAP+AO}	9 (6) ^a	1.1 (0.3) ^{ab}	11 (2) ^{ab}
Q _{EAP+EOP}	10 (6) ^a	1.1 (0.3) ^a	11 (3) ^a

Els valors dels paràmetres mecànics obtinguts per als films de quitosà pur foren menors que els trobats a la bibliografia (Sánchez-González *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2009), degut a la utilització de glicerol. El glicerol, empleat com a plastificant, es situa entre les cadenes polimèriques disminuint la tensió i deformabilitat en el punt de fractura i donant lloc, per tant, a films amb menor resistència mecànica (Fabra *et al.*, 2008).

La incorporació d'EAP dóna lloc a films menys resistents (menor tensió) i menys deformables (menor E%), i aquests canvis foren majors a l'addicionar àcid oleic a les formulacions. La presència de discontinuïtats estructurals en

la matriu polimèrica del film com a conseqüència de l'aparició de la fase lipídica dispersa explica aquests canvis, tal i com ha seguit observat per altres autors (Srinivasa *et al.*, 2007; Osés *et al.*, 2009).

La rigidesa dels films no va variar de forma significativa ($p > 0.05$), excepte per als films amb EAP i sense AO o EOP, que augmentà, donant lloc a films més rígids.

3.2.3. PERMEABILITAT AL VAPOR D'AIGUA I A L'OXIGEN

La permeabilitat al vapor d'aigua (PVA) i a l'oxigen (PO_2) van ser mesurades a 25°C i 53% d'humitat relativa. Ambdós paràmetres mesuren la capacitat barrera dels films a dits components. A la taula 3.5 podem observar els valors de les mitges i desviacions estàndard obtinguts de l'anàlisi estadístic (ANOVA).

TAULA 3.5.- Permeabilitat al vapor d'aigua (PVA) i permeabilitat a l'oxigen (PO_2) dels films equilibrats a 25°C i 53% d'humitat relativa. Valors de les mitges i desviacions estàndard de l'anàlisi estadístic.

Film	PVA (g/Pa s m)x10 ¹⁰	PO ₂ (cm ³ μ/m ² dia kPa)
Q	34 (5) ^b	54 (10) ^a
Q _{EAP}	28 (6) ^{ab}	8 (1) ^a
Q _{EAP+AO}	26 (4) ^{ab}	76 (11) ^b
Q _{EAP+EOP}	23 (6) ^a	234 (18) ^c

La PVA trobada als films purs de quitosà va ser menor que els valors trobats a la bibliografia, degut de nou a l'ús del glicerol a les formulacions, que provoca aquest efecte en los films polimèrics. La PVA va disminuir sols significativament amb la incorporació de l'àcid oleic, com a conseqüència de l'augment de la fracció hidrofòbica dels films, que contribueix a la millora de les propietats barrera a l'aigua.

A la taula 3.5 podem observar que hi ha grans diferències en quant als valors de PO_2 , apreciant-se que aquesta disminueix significativament ($p < 0,05$) amb l'addició d'EAP, però augmenta de manera considerable ($p < 0,05$) quan s'incorpora l'àcid oleic, i encara més quan ho fa en forma d'EOP. En general, els recobriments a base de biopolímers hidrofílics han mostrat ser una bona barrera a l'oxigen (Sothornvit *et al.*, 2007). La complexa composició del propolis fa que s'establesquen noves relacions intra i intermoleculares entre l'EAP i la matriu polimèrica que han de tenir-se en compte alhora d'analitzar la capacitat barrera. En aquest cas, les interaccions donen lloc a què aquests films siguin una important barrera a l'oxigen, que haurà de tenir-se en compte alhora de la seua aplicació.

La PO_2 , augmenta en presència de l'àcid oleic, la qual cosa pot ser atribuïda al fet que els àcids grassos actuen com a barrera a molècules polars, com l'aigua, gràcies a la seua hidrofobicitat, però aquesta propietat es veu afectada quan es tracta de soluts petits com l'oxigen (Widomska *et al.*, 2007), els quals poden difondre lliurement a través d'ells. Aquest efecte

s'intensifica si utilitzem EOP, degut a una nova reorganització estructural en el sistema.

3.2.4. ANÀLISI MICROSTRUCTURAL

L'estructura final del film depèn de l'ordenació dels diferents components en les FFRs, de la seua evolució durant el secat dels films i de les interaccions entre ells. La figura 3.3 mostra les micrografies de la secció transversal dels films obteses mitjançant microscopia electrònica d'escandallatge (SEM). Com es pot observar, els films de quitosà pur presenten una superfície homogènia i contínua, tal i com ha segut observat prèviament per Vargas *et al.* (2009). A més la incorporació d'EAP dona lloc a una estructura quebrada, tal i com ho va observar Pastor *et al.* (2010) en films a base d'hidroxiopropil metilcel·lulosa i extracte alcohòlic de propolis. L'addició d'àcid oleic donà lloc a canvis apreciables en l'estructura dels films, ja que la seua presència forma agregats en la matriu polimèrica, com ja s'ha descrit en els resultats de l'anàlisi de tamany de partícula, causant discontinuïtats en la mateixa tal i com es pot observar als films de Q_{EAP+AO} i $Q_{EAP+EOP}$ els quals presenten estructures molt similars.

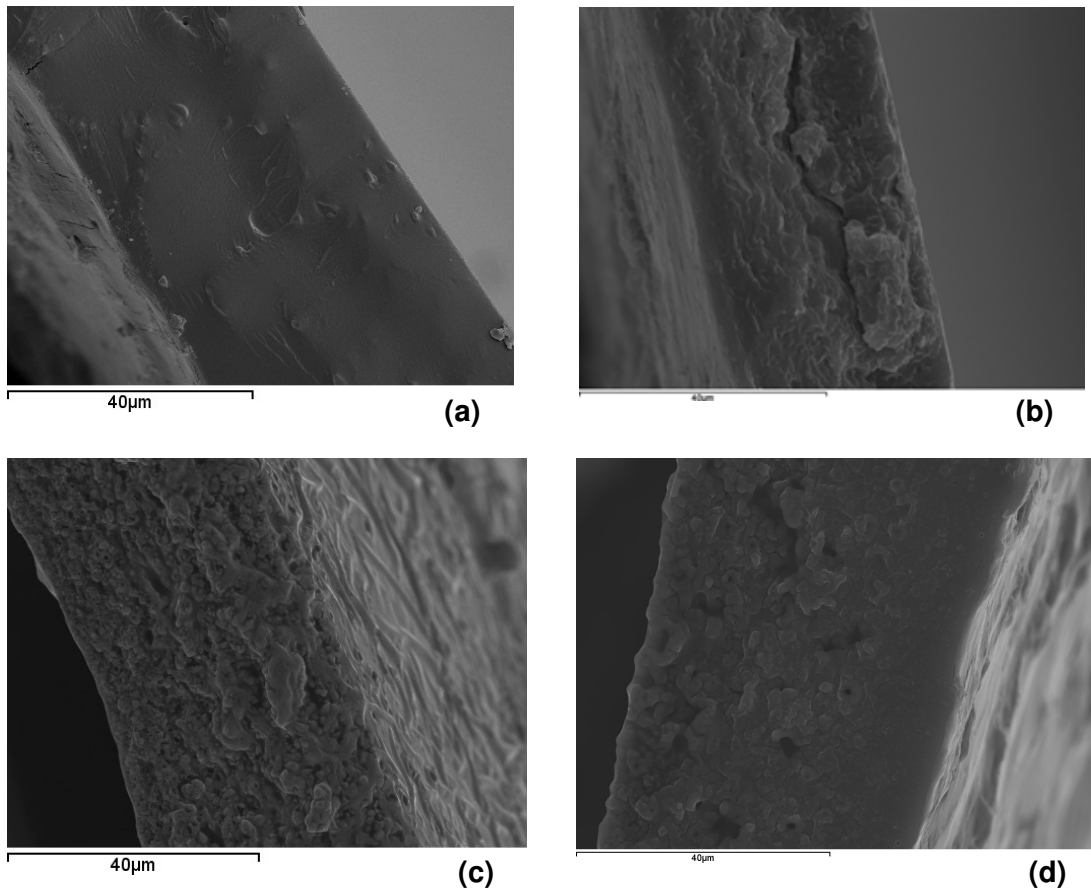


FIGURA 3.3.- Micrografies obtingudes mitjançant SEM dels diferents films: (a) Q, (b) Q_{EAP} , (c) Q_{EAP+AO} , (d) $Q_{EAP+EOP}$.

4. CONCLUSIONS

La incorporació d'extracte aquós de propolis a les formulacions donà lloc a canvis significatius en les propietats fisicoquímiques de les formulacions formadores de recobriments i en els films secs. Els anàlisis posaren de manifest la possible presència d'interaccions entre el quitosà i els components del propolis, en coherència amb una menor viscositat de les dispersions i una millora en les propietats barrera dels films composite, tant al vapor d'aigua com a l'oxigen. Els baixos valors obtinguts de la PO_2 per als films de Q_{EAP} deuen tenir-se en compte alhora de la seua aplicació a aliments, sobre tot a aquells que requeresquen barreres baixes d'oxigen per a la seua conservació.

La incorporació d'àcid oleic suposà també canvis en les propietats de les FFRs i films, en coherència amb l'aparició d'una nova fase dispersa lipídica i el seu major caràcter hidrofòbic.

En general, els films composite tingueren una major opacitat, una menor resistència mecànica i PVA.

5. AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen la financiació al Ministeri d'Educació i Ciència (Projecte AGL2007-65503).

6. REFERÈNCIES

- ASTM, 1999. Standard test method for specular gloss. Standard Designation: D523-89. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM, 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation: D882-09. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. 2004. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. 2008. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45, 21-43
- Gennadios, A., Weller, C.L., Gooding, C.H. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.

- Hutchings, J.B. 1999. *Food Color and Appearance*, 2nd ed. Ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Juliano, C., Pala, C.L., Cossu, M. 2007. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17, 177-181.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
- McHugh T.H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J.M. 1993. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58, 899-903.
- Nagai, T., Inoueb, R., Inoueb, H., Suzuki, N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80, 29-33.
- Osés, J., Fernández-Pan, I., Mendoza, M., Maté, J.I., 2009. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 23, 125-131.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Marcilla, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González-Martínez, C. 2011. Quality and safety of table grapes coated with HPMC edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 64-70.
- Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2010. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1174-1183.
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Thararnrthan, R.N., 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1113-1122.
- Sánchez-Gonzalez, L., Cháfer, M., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C., 2010. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82, 277-283.
- Sothornvit, R., Pitak, N., 2007. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International*, 40, 365-370.
- Tosi, E.A., Ré, E., Ortega, M.E., Cazzoli, A.F. 2007. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 104, 1025-1029.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., Gonzalez-Martinez, C. 2009. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23, 536-547.
- Widomska, J., Raguz, M., Subczynski, W.K., 2007. Oxygen permeability of the lipid bilayer membrane made of calf lens lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 2635-2645.