

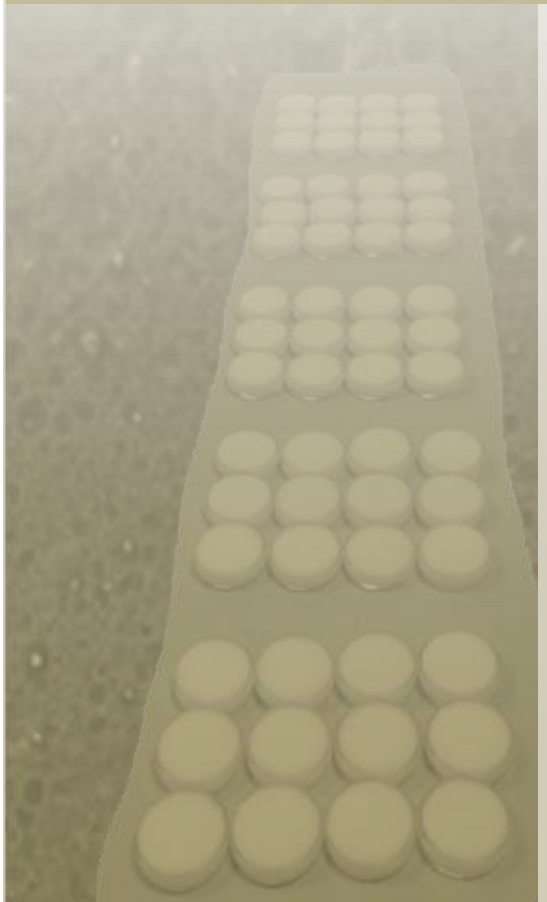


UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO
NATURAL



MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIOXIDANTES DE PELÍCULAS DE ALMIDÓN DE TRIGO Y QUITOSANO



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

Realizado por:

EMMA TALÓN ARGENTE

Directoras:

LORENA ATARÉS HUERTA

MARÍA VARGAS COLÁS

Directora experimental:

JEANNINE BONILLA LAGOS

VALENCIA, 2012

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIOXIDANTES DE PELÍCULAS DE ALMIDÓN DE TRIGO Y QUITOSANO

Emmanuelle Talón Argente, Jeannine Bonilla Lagos, Lorena Atarés Huerta, María Vargas Colás

RESUMEN

Se elaboraron películas comestibles de almidón de trigo nativo (WS) y quitosano (CH) y se adicionaron diferentes ingredientes activos: aceites esenciales de albahaca (B) y tomillo (T), ácido cítrico (CA), α -tocoferol (TF) (proporción respecto al almidón de 1:0,1) y glicerol como plastificante. Se acondicionaron las películas a 5°C-58%HR y 25°C-53%HR. Se caracterizaron sus propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua y al oxígeno, microestructura, brillo y color. Se determinó también la capacidad antioxidante de los ingredientes activos aislados y de las películas mediante un método espectrofotométrico. Las películas se aplicaron a muestras de manteca de cerdo para evaluar su actividad antioxidante.

La incorporación de los aditivos tuvo un efecto significativo en las propiedades mecánicas de las películas. La presencia de aceites esenciales aumentó la permeabilidad al vapor de agua mientras que el CA y TF la disminuyeron. Todas las películas fueron una barrera efectiva frente a la oxidación lipídica. Los fenómenos de desestabilización durante la etapa de secado provocaron irregularidades en la estructura de las películas, sobre todo en las que incorporaron α -tocoferol.

Palabras clave: películas comestibles, almidón de trigo, quitosano, aceites esenciales, tomillo, albahaca, α -tocoferol, ácido cítrico, ABTS, índice de peróxidos.

RESUM

Es van elaborar films comestibles de midó de blat natiu (WS) i quitosano (CH) y es van adicionar diferents ingredients actius: olis essencials de alfàbega (B) y timó (T), àcid cítric (CA), α -tocoferol (TF) (proporció respecte al midó de 1:1.1) y glicerol com a plastificant. Es van condicionar els films a 5°C-58%HR i 25 °C-53%HR. Es van caracteritzar les seues propietats mecàniques, barrera al vapor d'aigua i a l'oxigen, microestructura, brillantor i color. Es va determinar també la capacitat antioxidant dels ingredients actius i dels films mitjançant un mètode espectrofotomètric. Els films es van aplicar en mostres de sagí de porc per a evaluar la seua activitat antioxidant.

La incorporació dels distints antioxidants va tindre un efect significatiu en les propietats mecàniques dels films. La presència de olis essencials van

augmentar la permeabilitat al vapor d'aigua mentre que el CA i TF la van disminuir. Tots els films foren una barrera efectiva a l'oxidació lipídica. Els fenòmens de desestabilització durant la etapa de secat provocaren irregularitats en la estructura del films, sobre tot en les que incorporaren α -tocoferol.

Paraules clau: films comestibles, midó de blat, quitosano, timó, alfábega, α -tocoferol, àcid cítric, ABTS, índex de peróxids.

ABSTRACT

Edible films were prepared from native wheat starch (WS) and chitosan (CH) and a wide range of active ingredients were added: essential oils of basil (B) and thyme (T), citric acid (CA), alpha-tocopherol (TF) (proportion with regard to starch of 1:0.1 and glycerol as plasticizer). The films were conditioned to 5°C-58%RH and 25°C-53%RH. Mechanical properties were characterized, water and oxygen permeability, microstructure, gloss and colour. The antioxidant capacity of both the active ingredients and films was also determined using a spectrophotometric method. The films were applied on lard samples to evaluate their antioxidant activity.

The incorporation of several antioxidants had a significant effect on the mechanical properties of the films. The presence of essential oils increased water permeability whereas the AC and TF decreased it. All films were an effective barrier against lipid oxidation. Destabilization phenomena during the drying step caused irregularities in the structure of the films, especially those which incorporated alpha-tocopherol.

Keywords: edible films, wheat starch, chitosan, thyme, basil, alpha-tocopherol, citric acid, ABTS, peroxides rate.

INTRODUCCIÓN

Las películas o recubrimientos comestibles se definen como finas capas de material apto para el consumo alimentario, que actúan como barrera frente a diferentes agentes (vapor de agua, oxígeno y aromas) aumentando así la vida útil del producto (Guilbert et al., 1996). Su utilización supone una alternativa prometedora en el campo de la conservación de alimentos, posibilitando la disminución de residuos plásticos. Adicionalmente, estos recubrimientos ofrecen la posibilidad de incorporar aditivos de interés, tales como aromas, agentes antimicrobianos o antifúngicos, y antioxidantes (Baldwin et al., 1996).

Los polímeros biodegradables a base de polisacáridos naturales, en particular almidón, pueden ser producidos a bajo coste y a gran escala. Los materiales a base de almidón pueden reducir la utilización de recursos no renovables. Además, el almidón nativo es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. El gránulo de almidón se compone

esencialmente de dos polisacáridos, amilosa y amilopectina, y algunos componentes menores tales como lípidos y proteínas. Este polímero ha atraído considerable atención como un polímero biodegradable termoplástico (Angellier et al., 2006). Las películas preparadas a base de almidón suponen prometedoras aplicaciones en el envasado de alimentos, debido a su carácter biodegradable, bajo coste, flexibilidad y transparencia. Sin embargo, varios autores han señalado que, a pesar de la facilidad de su preparación, estas películas presentan algunos inconvenientes, como sus pobres propiedades mecánicas que hacen necesaria la adición de compuestos plastificantes (Parra et al., 2004). Por lo tanto, se pueden obtener films de características mejoradas a partir de sistemas multicomponente donde los polisacáridos forman una red continua y los lípidos aportan las propiedades barrera.

El quitosano es un polisacárido catiónico que se deriva de la desacetilación de la quitina, un componente de los caparazones de crustáceos. Tiene la capacidad de formación de una película resistente, en combinación con otros materiales como almidón, sin necesidad de adicionar compuestos plastificantes. Además, se ha demostrado que puede ejercer una cierta actividad antimicrobiana y antioxidante (Dutta et al., 2009; Kumar, 2000). Su aplicación actualmente está limitada por su precio relativamente alto y su elevada permeabilidad al vapor de agua (Butler et al., 1996).

La adición de aceites esenciales (albahaca y tomillo), y de otros componentes con actividad antioxidante como el tocoferol (antioxidante liposoluble) y ácido cítrico (ácido orgánico), puede mejorar las propiedades funcionales de las películas comestibles y aumentar sus usos potenciales para la conservación de alimentos con elevado contenido graso. La incorporación de los ingredientes con capacidad antioxidante pueden modificar las propiedades barrera al vapor de agua y al oxígeno de los films, además de obtenerse ventajas adicionales como la protección frente al crecimiento microbiano y la oxidación lipídica (Gutiérrez et al., 2008; Ahn et al., 2008). En este sentido, se plantea el reto de encontrar formulaciones apropiadas para retardar la oxidación de lípidos fácilmente oxidables en productos con alto contenido graso (como pueden ser la manteca de cerdo, mantequilla, tocino, etc.).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la adición de diferentes ingredientes con efecto antioxidante - aceites esenciales (albahaca y tomillo), un antioxidante orgánico (ácido cítrico) y un antioxidante liposoluble (tocoferol)- sobre las propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua y oxígeno, microestructurales y ópticas (brillo y color) de films de almidón de trigo y quitosano. Adicionalmente, se determinó el poder antioxidante de los aditivos y de los films a través de un método espectrofotométrico, y la capacidad de protección de las películas frente a la oxidación lipídica de manteca de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la elaboración de las películas se utilizó: almidón nativo de trigo (WS) con un porcentaje de amilosa de 21% (Roquette Laisa S.A., Benifaió, Valencia, España), quitosano de alto peso molecular (CH) (Lote MKBB0585, Sigma – Aldrich, Madrid, España), aceite esencial de albahaca (B) y de tomillo (T) (Herbes del Molí, Alcoi, Alicante, España), tocoferol (TF), ácido cítrico (CA), (Sigma-Aldrich, Madrid, España), glicerol, ácido acético glacial, nitrato magnésico (Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España).

Para la determinación de la actividad antioxidante de las películas se utilizó manteca de cerdo suministrada por un mercado local. Los reactivos empleados fueron: ácido acético glacial, isooctano, yoduro potásico, tiosulfato sódico anhidro y ácido clorhídrico (Panreac química S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España).

En el ensayo de la capacidad antioxidante (TEAC) se utilizó trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), peroxodisulfato potásico y ABTS (ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]), todos suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Diseño experimental y preparación de los films

Se preparó una disolución de WS al 1% (p/p) en agua destilada. Se añadió glicerol en una proporción másica respecto al almidón de 1:0,15. Esta dispersión se llevó a calentamiento en baño termostataado a 95 °C durante 40 minutos. Por otro lado, se dispersó CH al 1% (p/p) en una disolución de ácido acético glacial al 1% (v/p), a 40 °C y 450 rpm, durante un periodo de 24 horas. Se mezclaron las dos disoluciones en una proporción WS:CH de 4:1 (p/p). Para obtener las formulaciones formadoras de película, se añadieron los ingredientes activos en la proporción respecto al almidón de 1:0,1. Como control se utilizó una formulación sin antioxidante obteniendo así cinco tipos de películas comestibles. Las formulaciones se homogeneizaron con rotor-estator (Yellow Line DL 25 Basic, IKA, Janke y Kunkel, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos, y se desgasificó a temperatura ambiente con una bomba de vacío.

Para obtener las películas se utilizaron placas de teflón de 150 mm de diámetro, manteniendo constante la masa de sólidos totales (1g). Las muestras se dejaron secar durante 48 horas a una humedad relativa de 50% ($\pm 2\%$) y a una temperatura ambiente de 25 °C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se acondicionaron a 5 °C y 25°C en desecadores a 58% y 53% de humedad relativa respectivamente, utilizando disoluciones saturadas de nitrato de magnesio.

Caracterización de las películas

ESPESOR

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) con una precisión de 0,001mm. Se tomaron valores de manera aleatoria. Estas medidas se utilizaron para el tratamiento de resultados en los ensayos de propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y permeabilidad al oxígeno (OP).

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron con una prensa universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882 (2001). Para cada formulación y a la temperatura de 25°C (53% de HR), se cortaron 8 muestras rectangulares (25 mm por 100 mm). Antes del ensayo de tensión se determinó el espesor de cada film tomando 4 valores en distintos puntos. Los films se montaron en pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas fue de 50 mm con una velocidad de elongación de 50 mm·min⁻¹.

Las curvas de fuerza frente a distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ) frente a deformación de Henky (ϵ_H) con las ecuaciones (1) y (2)

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S(t)} = \frac{F(t) \cdot (L_0 + d(t))}{b \cdot e \cdot L_0} \quad (1)$$

$$\epsilon_H = \ln\left(\frac{L_0 + d(t)}{L_0}\right) \quad (2)$$

Donde: L_0 = longitud inicial del film (m); b = base de la muestra rectangular (m); e = espesor del film (m); $d(t)$ = incremento de la longitud de la muestra a cada tiempo (m); $S(t)$: área transversal de la muestra (m²); $F(t)$ = fuerza de tensión en cada tiempo (N).

De las curvas σ vs. ϵ_H se obtuvieron los parámetros TS (tensión de fractura, en MPa), EM (módulo de elasticidad o modulo de Young, pendiente de la zona lineal de la curva, en MPa) y %E (deformación hasta el punto de fractura, expresado en porcentaje respecto a L_0).

HUMEDAD Y PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

Tras el equilibrado de los films a humedad relativa constante, las muestras se almacenaron en desecadores con pentóxido de fósforo hasta alcanzar masa constante. El ensayo se realizó por triplicado. La humedad de las películas se expresó en masa de agua / masa de film seco.

Se estudió el efecto de las variables temperatura y formulación sobre la WVP para valorar las posibles interacciones entre éstas. Para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993). Se cortaron tres muestras circulares para cada formulación de 3,5 cm de diámetro, seleccionando films sin defectos visibles, y para cada muestra se determinó el espesor en 6 puntos aleatorios. Estas muestras se acoplaron sobre copas de aluminio (3,5 cm diámetro, Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se había depositado 5 ml de agua destilada (HR 100%). La cara del film en contacto con el aire durante el secado se colocó en cada caso hacia el ambiente (HR del 53% para la temperatura de 25 °C, y HR del 58% para 5 °C). Para asegurar la hermeticidad del sistema, se colocó un anillo de caucho y tres mordazas. Las copas se introdujeron en un soporte con un ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados con soluciones saturadas de nitrato magnésico. Los desecadores se almacenaron en una cámara Hotcold UL (JP Selecta, Barcelona, España) y se monitorizó la masa de las copas con una balanza analítica (ME36S, Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 horas durante un periodo de tiempo de 24h.

La pendiente de la representación de la pérdida de masa frente al tiempo, se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua (VTVA). La presión de vapor de agua en la cara interior del film (p_2) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.* (1993), para corregir el efecto de gradientes de concentración establecidos en el espacio de cabeza de la copa (3)

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot \ln \left[\frac{(P - p_2)}{(P - p_1)} \right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (3)$$

Donde: P = presión total (atm); D = difusividad del agua en aire a 25°C (m^2/s); R = constante de los gases ($82,057 \cdot 10^{-3} m^3 atm kmol^{-1} K^{-1}$); T = temperatura (K); Δz = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final; p_1 = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm); p_2 = presión de vapor corregida en la cara interior del film.

Utilizando la ecuación (4), WVP se calculó a partir de p_2 y la presión de vapor de agua en la cara exterior del film (p_3) y el espesor (e).

$$WVP = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot e \quad (4)$$

PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

Para el estudio de la permeabilidad al oxígeno (OP) se cortaron las películas de forma hexagonal y se midió su espesor en 4 puntos aleatorios. Las películas fueron expuestas a flujos de oxígeno y nitrógeno por medio del equipo Ox-Tran (Modelo 1/50, Mocon, Minneapolis, EEUU), que se ajusta al

método estándar ASTM D3985-05 (2010). Las pruebas fueron conducidas en modo continuo a 10°C- 58% HR y 25°C- 53% HR. La OP se calculó dividiendo la tasa de transferencia de oxígeno ($\text{cm}^3 \cdot \text{mm}/(\text{m}^2 \cdot \text{atm} \cdot \text{día})$) por la diferencia de presión de oxígeno entre los dos lados de la película, y multiplicando por el espesor promedio de la misma, según la ecuación (5). Se realizaron dos repeticiones por cada formulación.

$$OP = \frac{TR}{p_{O_2}} \cdot e \quad (5)$$

Donde: TR = transferencia de oxígeno ($\text{cm}^3 \cdot \text{mm}/(\text{m}^2 \cdot \text{atm} \cdot \text{día})$); p_{O_2} = diferencia de presión de oxígeno entre los dos lados de la película y e = espesor promedio.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se obtuvieron imágenes longitudinales y transversales de las películas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) (JSM-5410, JEOL, Japón). Las muestras para observaciones transversales se prepararon por criofractura mediante inmersión en nitrógeno líquido. Pequeñas porciones de los films se montaron sobre portas de cobre y se recubrieron con oro. El voltaje utilizado fue 10kV.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

Se observó la morfología superficial de las películas, previamente equilibradas con una disolución saturada de cloruro magnésico (Panreac, Barcelona, España), mediante un microscopio de fuerza atómica (AFM) (Nanoscope III.a, Scanning Probe Microscope, Digital Instruments, Inc. Santa Bárbara, California). Se cortaron tres muestras cuadradas de 1x1 cm para cada formulación, y se realizó un barrido superficial utilizando el modo tapping, sobre un área de 50x50 μm y con un límite vertical máximo de 6 μm impuesto por el equipo. De acuerdo con el método ASME B46.1 (1995), se calcularon los siguientes parámetros estadísticos relacionados con la rugosidad de la superficie en cada imagen tridimensional obtenida:

Rugosidad promedio (R_a): promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de la altura respecto a un plano medio (6)

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad (6)$$

Rugosidad media cuadrática (R_q): raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio (Z_j) al cuadrado (7)

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N z_j^2}{N}} \quad (7)$$

ISAD (%): diferencia de área relativa entre la superficie real y la superficie geométrica.

PROPIEDADES ÓPTICAS

Se utilizó un espectrocolorímetro (CM3600d, Minolta, Tokio, Japón), con un iluminante D65 y un ángulo de observación de 10°. Las lecturas se tomaron en 3 puntos aleatorios sobre la superficie expuesta al ambiente durante el secado en las placas de teflón de cada película, sobre fondo blanco y negro (estándares). Se determinó el nivel de transparencia/opacidad de las muestras a través del parámetro de transmitancia interna (Ti), calculado según las ecuaciones (8-10) (Hutchings, 1999), donde se tiene en cuenta la reflectancia de la muestra (R) medida sobre un fondo negro de reflectancia conocida (Rg) la reflectancia de la muestra sobre un negro ideal (Ro).

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_o - R + R_g}{R_o \cdot R_g} \right) \quad (8)$$

$$b = \sqrt{a^2 - 1} \quad (9)$$

$$T_i = \sqrt{(a - R_{negro})^2 - b^2} \quad (10)$$

Los valores de reflectancia infinito (ecuación (11)) fueron utilizados para determinar las coordenadas CIE Lab (L^* , a^* , b^*) y los parámetros cromáticos, Croma (C^*_{ab}) (12) y tono (h^*_{ab}) (13) que se calcularon aplicando las siguientes ecuaciones:

$$R_\infty = a - b \quad (11)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (12)$$

$$h^*_{ab} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (13)$$

El brillo se midió con un bríllómetro (Multi-Gloss 268, Konica Minolta, Langenhagen, Alemania) a 20°, 60° y 85° de acuerdo con la norma ASTM D523 (1999) en dos películas de cada formulación previamente acondicionadas (25 °C y 53% HR) y tomando 6 medidas en la cara expuesta al ambiente durante el proceso de secado.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante a través de un método espectrofotométrico descrito por Re *et al.* (1998). Este método está basado en comparar la actividad antioxidante de la sustancia analizada con la de un patrón antioxidante, el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), derivado de la vitamina E. Con este fin, se utiliza el ABTS (ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) previamente oxidado al radical catiónico ABTS^{•+}, de coloración azul. Se preparó una disolución acuosa de ABTS 7 mM y peroxodisulfato potásico 2,45 mM, que permaneció en oscuridad durante unas 16h, obteniéndose el radical catiónico coloreado. Se diluyó en etanol hasta una absorbancia inicial (A_0) de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734nm. Todas las determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 730, England), utilizando etanol como blanco, y a esa misma longitud de onda.

El ensayo de la capacidad antioxidante de los ingredientes activos se llevó a cabo diluyéndolos en etanol previamente, de tal modo que la adición de cierto volumen (10 μ l – 100 μ l) de dilución sobre 900 o 990 μ l de dilución de ABTS^{•+} provocara una reducción de la absorbancia comprendida entre el 15 y el 80% a los 6 minutos. Se registró el valor de A cada minuto obteniéndose finalmente A_6 . Se realizaron tres repeticiones por determinación. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó con la ecuación (14):

$$\% \text{reducción A} = \frac{A_0 - A_6}{A_0} \cdot 100 \quad (14)$$

Se repitió el procedimiento con diferentes diluciones de trolox como agente antioxidante, para obtener una recta de calibrado que relacionara el porcentaje de reducción de A con la concentración de agente antioxidante presente para 6 minutos. La capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity) se determinó comparando el correspondiente porcentaje de reducción de la absorbancia con la curva patrón.

Adicionalmente se determinó la capacidad antioxidante de las películas disueltas en una disolución hidroalcohólica (50% etanol – 50% agua destilada). Para ello, se pesaron 0,5 g de cada película y se disolvieron en la mezcla, durante 12 horas en agitación, teniendo en cuenta la concentración resultante. El ensayo de la actividad antioxidante se completó utilizando el mismo procedimiento anteriormente descrito.

APLICACIÓN DE LAS PELÍCULAS SOBRE UN ALIMENTO GRASO

Para evaluar el efecto protector de las películas frente a la oxidación lipídica, se observó la evolución del índice de peróxidos en manteca de cerdo almacenada a 25°C y 53%HR. Para ello, se rellenaron cápsulas de vidrio de 15 mm de diámetro interior, con manteca de cerdo y se enrasaron con una espátula. Por otro lado, se obtuvieron muestras de las diferentes películas de 15 mm de diámetro que se depositaron centrados sobre la

superficie de la manteca dejando expuesta al ambiente la misma cara que se dejó durante el secado en las placas de teflón, evitando burbujas de aire entre el film y la grasa. Para garantizar el sellado y hermeticidad del sistema se selló con vaselina. Se realizaron 3 repeticiones para cada película y tiempo de almacenamiento. Como control se utilizaron cápsulas no recubiertas.

El índice de peróxidos (IP) se determinó siguiendo la norma UNE 55-023 y los resultados se expresaron en meq de oxígeno por kg de grasa.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, Md.). Se utilizó el método LSD (Método de la Mínima Diferencia Significativa) para el análisis de resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microestructura

La microestructura de las películas se estudió de forma cualitativa, con la finalidad de ver como se organizan los componentes y observar los efectos en los cambios de la estructura cuando se le adicionan ingredientes activos. En la Figura 1 se muestra la microestructura de la superficie expuesta al aire durante el secado. En la Figura 2 se muestran las micrografías de secciones transversales de las películas.

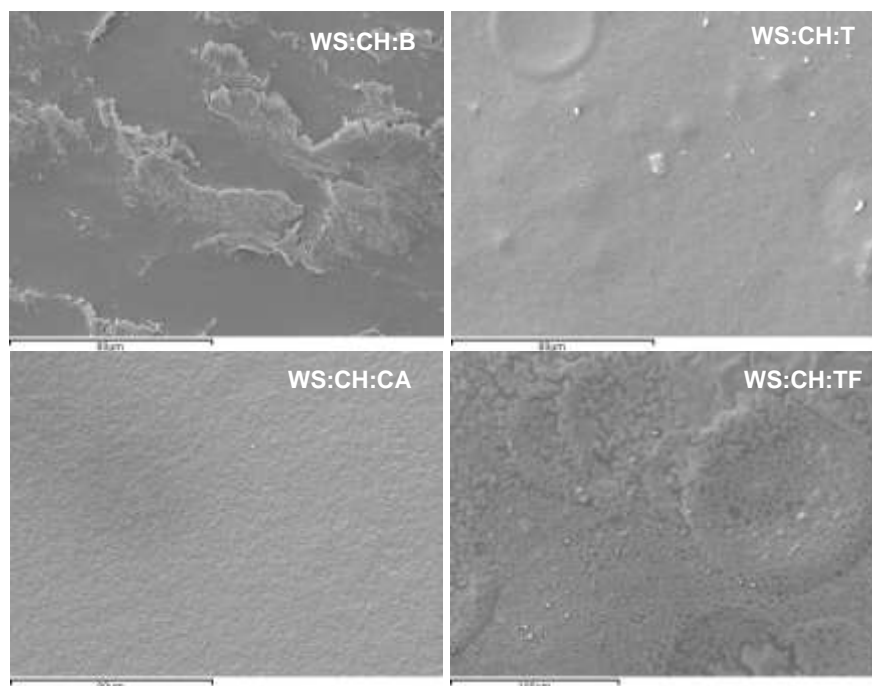


FIGURA 1. Micrografías SEM de la superficie de las películas (1500x).

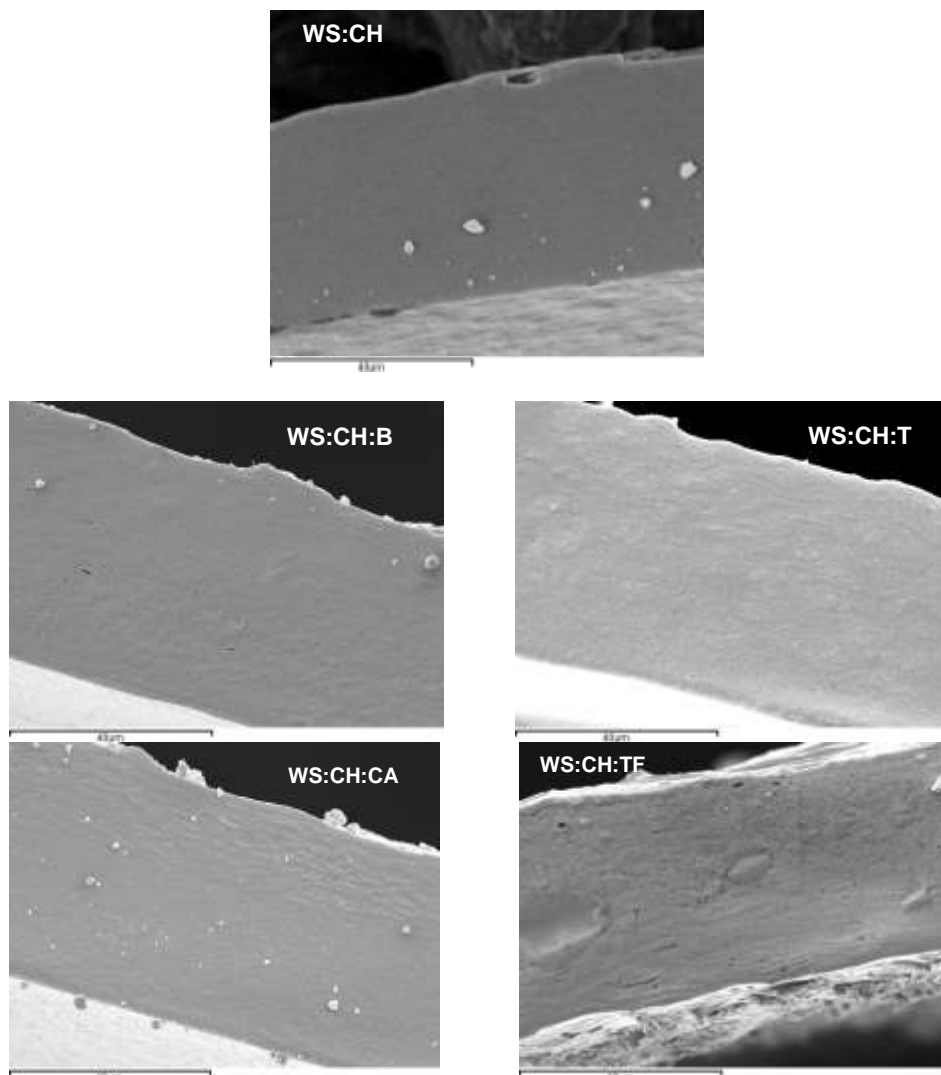


FIGURA 2. Micrografías SEM de la sección transversal de las películas (1500x).

Se observó que la película que no incorpora aditivos (WS:CH) presentó una estructura compacta, ordenada, sin presencia de poros, lo que indica que el almidón de trigo y el quitosano, tienden a formar una estructura homogénea, dada la alta compatibilidad entre los dos polímeros (Bonilla et al., 2012; Atarés et al. 2010). Cuando se incorporaron los ingredientes activos se observaron cambios estructurales en función de la naturaleza del aditivo. Los aceites esenciales se integraron en diferente grado en la matriz polimérica. En el caso del aceite esencial de tomillo no se observó separación de fases y la película mantuvo una estructura homogénea observable tanto en la fractura transversal como en la superficie expuesta al aire. El aceite esencial de albahaca parece que experimentó una cierta separación durante el secado, de modo que se detectaron pequeñas gotas atrapadas en la matriz de polímeros. La incorporación de ácido cítrico no pareció afectar la homogeneidad de las películas, por lo que se observaron estructuras sin irregularidades tanto al corte como en superficie. Por el contrario, la formulación con tocoferol presentó un alto grado de

heterogeneidad, probablemente debido a una baja compatibilidad con los polímeros. Así se observaron gotas en superficie y una notable separación de fases en la sección transversal, debido a fenómenos de floculación y coalescencia durante el secado de las películas. El aspecto de estas gotas en las micrografías es cóncavo o convexo en función del efecto de la criofractura sobre la estructura.

Para cuantificar el efecto de la incorporación de los ingredientes activos sobre la topografía superficial de las películas, se realizaron observaciones de las muestras mediante AFM (Figura 3).

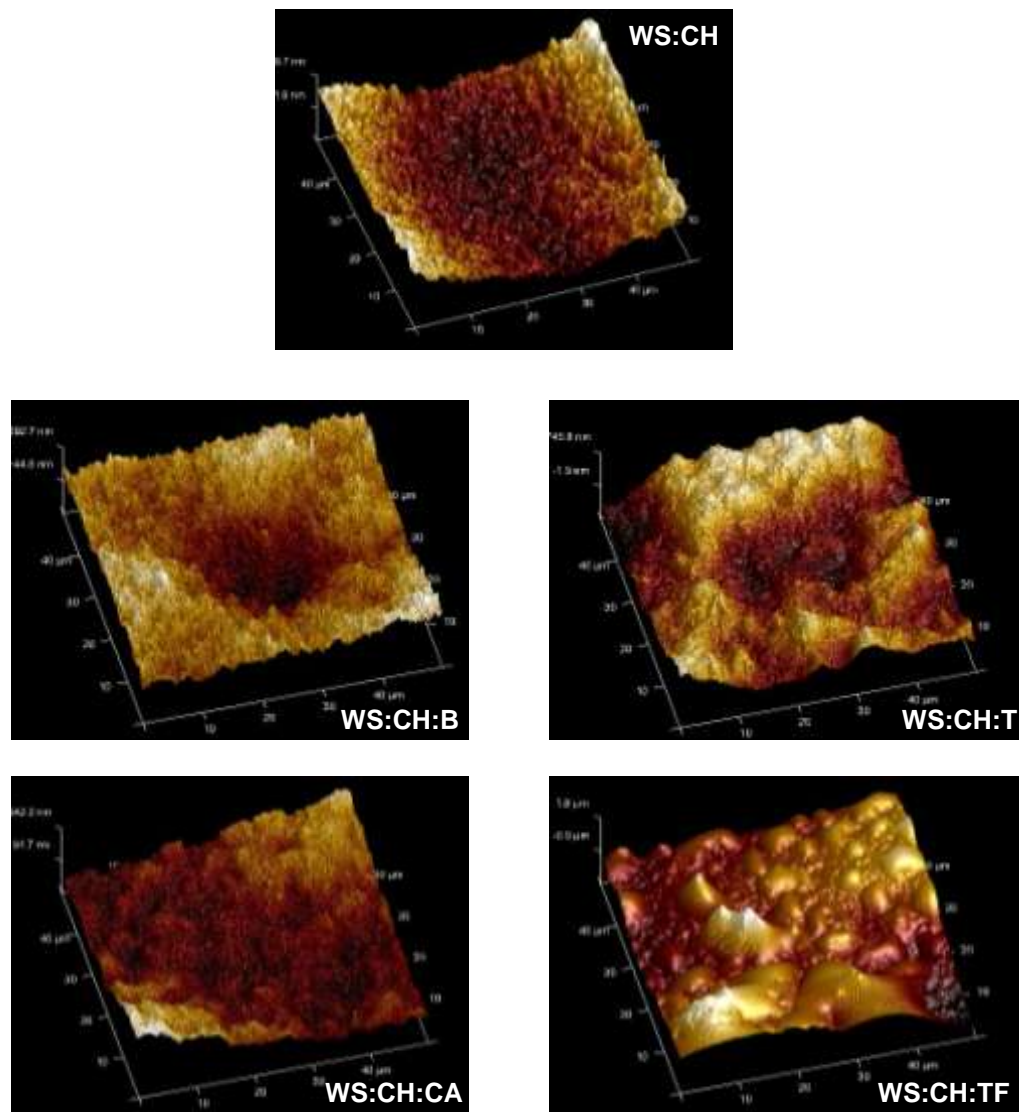


FIGURA 3. Micrografías de la superficie de los films obtenidas a través de AFM.

TABLA 1. Parámetros de rugosidad y brillo de las películas. Valores promedio y desviación estándar entre paréntesis.

Película	Rq (nm)	Ra (nm)	ISAD (%)	Brillo (60°)
WS:CH	147 (41) ^{ab}	113 (38) ^{ab}	0,8 (0,3) ^a	51 (16) ^c
WS:CH:B	109 (35) ^a	85 (27) ^a	1,4 (0,2) ^{ab}	19 (14) ^a
WS:CH:T	212 (42) ^b	172 (37) ^b	1,22 (0,07) ^{ab}	13 (2) ^a
WS:CH:CA	109 (23) ^a	86 (18) ^a	0,89 (0,03) ^a	31 (18) ^b
WS:CH:TF	486 (125) ^c	371 (124) ^c	4 (3) ^b	13 (3) ^a

Las letras ^{abc} denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

La incorporación de los diferentes aditivos no tuvo efectos importantes ni sobre la topografía superficial obtenida mediante AFM ni coherentemente sobre los correspondientes parámetros de rugosidad, a excepción del tocoferol. En estas películas se observó un relieve mucho más abrupto y un aumento significativo de todos los parámetros de rugosidad.

Propiedades ópticas

El brillo de las películas está ligado a la morfología de su superficie (Sánchez-González et al. 2010) y, en general, cuanto más lisa sea la superficie, más brillante es el film. Los resultados de brillo a 60° se muestran en la Tabla 1. Este ángulo fue elegido siguiendo las directrices de la norma ASTM D523 (1999). El brillo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) al añadir todos los ingredientes activos. Las diferencias más notables se observaron en las películas que incorporan aceite esencial de tomillo y las que contienen tocoferol, que fueron además las más rugosas, coherentemente con los resultados de AFM y con las imágenes mostradas en la Figura 2.

La Tabla 2 muestra los valores de luminosidad, croma y tono (recalculados para un espesor infinito).

TABLA 2. Luminosidad (L^*), Croma (C^*_{ab}), tono (h^*_{ab}) e índice de blancura (IB) de las películas.

Película	L^*	h^*_{ab}	C^*_{ab}	IB
WS:CH	82 (2) ^a	96,6 (0,6) ^a	10,3(0,9) ^a	79 (2) ^{ab}
WS:CH:B	88 (3) ^b	98,2 (0,9) ^a	11 (5) ^a	84 (6) ^b
WS:CH:T	84,4 (0,4) ^{ab}	95,2 (0,2) ^a	12,8 (0,6) ^{ab}	79,8 (0,6) ^{ab}
WS:CH:CA	86,9 (0,6) ^b	97,8 (0,6) ^a	10,0 (0,4) ^a	83,5 (0,5) ^b
WS:CH:TF	83,0 (0,4) ^a	89,5 (0,6) ^a	15,7 (0,9) ^b	76,8 (0,9) ^a

Las letras ^{ab} denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

La incorporación de los diferentes aditivos en general no tuvo efectos muy marcados sobre el color de las películas. No obstante, se detectó una mayor intensidad del tono amarillento y una mayor pureza significativa de

color (mayor croma) en las películas que incorporan tocoferol. Coherentemente, el índice de blancura fue menor en las películas con tocoferol que en el resto de formulaciones.

La transmitancia interna de las películas a distintas longitudes de onda se muestra en la Figura 4.

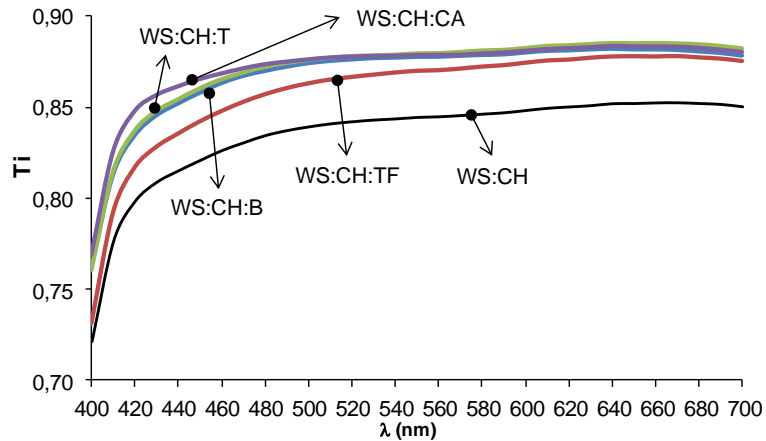


FIGURA 4. Curva media de transmitancia interna (T_i) para cada formulación.

Las películas que incorporan ingredientes activos mostraron un espectro de transmitancia interna similares en cuanto a forma al de las películas sin aditivos, en coherencia con la similitud en el color de todas las formulaciones. Los valores de transmitancia fueron siempre superiores en las películas con agentes añadidos. Esto puede deberse a los diferentes grados de heterogeneidad que imparten los aditivos en la matriz polimérica, dando lugar a una estructura más abierta y con cambios en el grado de transparencia-opacidad.

Propiedades mecánicas

La Figura 5 muestra la curva de esfuerzo de tracción vs deformación de Henky típica de las películas.

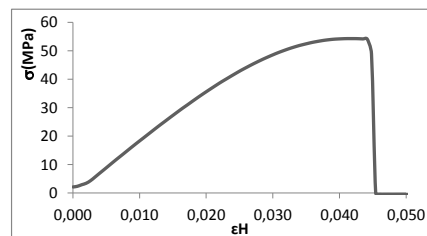


FIGURA 5. Curva típica de esfuerzo-deformación de las películas.

Los parámetros mecánicos, módulo de elasticidad (EM), esfuerzo de rotura (TS) y deformación de fractura (%E) de todas las formulaciones estudiadas se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3. Parámetros mecánicos y espesor de las películas. Valores medios y desviaciones estándar en paréntesis.

Película	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)	Espesor (μm)
WS:CH	1458 (151) ^a	44 (3) ^b	4,3 (0,8) ^{cd}	52,7 (1,6) ^{ab}
WS:CH:B	1712 (46) ^{bc}	54 (1) ^c	4,3 (0,6) ^{bc}	57 (5) ^{bc}
WS:CH:T	1450 (201) ^a	43 (7) ^b	3,6 (0,6) ^b	54,8 (11,4) ^{bc}
WS:CH:CA	1418 (605) ^c	34 (12) ^a	3,0 (1,0) ^a	52 (8) ^a
WS:CH:TF	1598 (106) ^b	47 (10) ^c	4,4 (1,4) ^d	58 (5) ^c

Las letras ^{abcd} denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las propiedades mecánicas de la formulación control son similares a las reportadas por Bonilla et al. (2012). La incorporación de los aditivos tuvo un efecto sobre los parámetros mecánicos dependiente del ingrediente activo. El aceite esencial de tomillo no dio lugar a cambios significativos en el comportamiento mecánico de las muestras. Las películas que incorporaban aceite esencial de albahaca o tocoferol, presentaron un aumento en el módulo de elasticidad y en la tensión de fractura con respecto a los puros (WS:CH). Por el contrario, la incorporación de ácido cítrico dio lugar a un descenso de la dureza, rigidez y elongación de fractura de las películas. Esto es debido a un efecto de entrecruzamiento del ácido cítrico con el almidón, como ha sido previamente descrito (Reddy y Yang, 2010).

Con respecto al espesor, las películas de ácido cítrico presentaron valores significativamente menores a las películas con tocoferol.

HUMEDAD DE EQUILIBRIO Y PROPIEDADES BARRERA

La humedad de equilibrio de las películas almacenadas en diferentes condiciones de humedad relativa y temperatura se muestra en la Tabla 4, junto con los resultados de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y permeabilidad al oxígeno (OP) a cada combinación de temperatura-gradiente de HR ensayada.

TABLA 4. Humedad de equilibrio (g agua/g película seca) y WVP (g·mm·kPa⁻¹·h⁻¹·m⁻²) para todos los films y condiciones experimentales. Permeabilidad al oxígeno (OP, cm³·mm⁻²·atm⁻¹·día⁻¹). Valores medios y desviaciones estándar en paréntesis.

Película	53% HR - 25°C			58% HR - 5°C (10°C en OP)		
	WVPx10 ⁻¹⁰	OPx10 ⁻²	%H (b.s.)	WVPx10 ⁻¹⁰	OPx10 ⁻²	%H (b.s.)
WS:CH	18 (2) ^{abc,1}	6,7 (0,7) ^{b,1}	8,4 (0,5) ^{a,1}	5,2 (0,5) ^{a,2}	3,8 (1,3) ^{a,2}	11,1 (0,7) ^{b,2}
WS:CH:B	19,1 (1,4) ^{c,1}	3,7 (1,0) ^{a,1}	8,67(0,13) ^{a,1}	6,5 (0,7) ^{b,2}	5,7 (0,4) ^{a,2}	13,11 (0,16) ^{c,2}
WS:CH:T	18,2 (0,5) ^{bc,1}	3,2 (0,2) ^{a,1}	8,62(0,16) ^{a,1}	8,3 (0,4) ^{c,2}	8,4 (0,7) ^{b,2}	11,1 (0,6) ^{b,2}
WS:CH:C A	15,6 (1,0) ^{a,1}	3,8 (0,7) ^{a,1}	8,8 (1,3) ^{a,1}	7,1 (0,2) ^{b,2}	5,2 (0,6) ^{a,2}	9,8 (0,4) ^{a,2}
WS:CH:T F	15,6 (1,3) ^{ab,1}	3,8 (0,7) ^{a,1}	8,2 (0,3) ^{a,1}	6,6 (0,5) ^{b,2}	8,9 (1,6) ^{b,2}	10,9 (0,4) ^{b,2}

Los subíndices ^{abc} denotan grupos homogéneos en función de la formulación (verticalmente) y ¹² en función de la temperatura (horizontalmente) (p<0,05).

La humedad de equilibrio que presentaron las películas fue mayor en los acondicionados a 58%HR-5°C que a 53%HR-25°C. La incorporación de aditivos no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la humedad de equilibrio (p>0,05).

El efecto de la incorporación de los ingredientes activos para WVP como OP dependió de la temperatura.

Para los valores de WVP, se observa que el factor con mayor impacto fue la temperatura. En general, un aumento de temperatura provoca una ligera disminución de la solubilidad y un aumento en la difusión del vapor de agua a través del film. Este aumento de la difusividad es debido a un mayor movimiento de los polímeros y del aumento de los niveles de energía de las moléculas (Bertuzzi et al. 2007).

A 25°C, la incorporación de TF o de CA dio lugar una disminución en la WVP, mientras que los aceites esenciales no tuvieron un efecto significativo. A 5°C todos los ingredientes activos dieron lugar a un aumento de los valores de WVP con respecto a las películas WS:CH.

Los resultados de OP a 25°C y 10°C se muestran en la Tabla 3. Para este parámetro el efecto de la temperatura fue menos marcado y sólo a 25°C la adición de los ingredientes activos supuso una reducción significativa de la permeabilidad el oxígeno, no existiendo diferencias entre ingredientes. A 10°C los aditivos no aportaron una mejora en las propiedades barrera al oxígeno de las películas.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la Tabla 5 se recoge la actividad antioxidante de los aceites esenciales, tocoferol, ácido cítrico y de las películas, expresada en equivalentes de trolox (TEAC), definidos como la concentración de trolox (mM) cuya actividad antioxidante equivale a la del extracto.

TABLA 5. Actividad antioxidante de los ingredientes activos y películas. Índice de peróxidos (IP) de la grasa de cerdo recubierta por las diferentes películas. Valores promedio y desviaciones estándar en paréntesis.

Ingrediente	TEAC (mM)	Película	TEAC (mM)	IP (meq O ₂ /kg grasa)
CH	10,1 (0,3) ^a	WS:CH	32 (7) ^c	5,8 (0,6) ^{ab}
B	11,4 (0,3) ^a	WS:CH:B	34,2 (0,9) ^c	3,59 (0,09) ^a
T	1,844 (0,012) ^a	WS:CH:T	14 (4) ^{ab}	6,8 (1,9) ^b
CA	0,88 (0,02) ^a	WS:CH:CA	3,29 (0,02) ^a	5,3 (1,5) ^{ab}
TF	2368 (137) ^b	WS:CH:TF	20,2 (1,1) ^b	5,6 (1,4) ^{ab}

Las letras ^{abc} denotan diferencias significativas (p<0,05).

El quitosano presentó cierta actividad antioxidante, tal y como se ha descrito previamente en otros estudios (Siripatrawan y Harte, 2010). Los aceites esenciales de albahaca y tomillo presentaron valores comparables a los observados por Shan et al., (2005). El ácido cítrico presentó una capacidad antioxidante similar a la del trolox. El tocoferol manifestó una capacidad antioxidante significativamente superior a la del resto de aditivos.

En el caso de las películas, el aceite esencial de albahaca dio lugar a un cierto aumento de la capacidad antioxidante de las películas redisueltas. Coherentemente con el TEAC de los componentes puros T y CA, las correspondientes películas exhibieron valores de TEAC relativamente reducidos. En el caso de las películas con TF, el valor final de TEAC podría deberse a la exposición al ambiente del aditivo, en coherencia con las observaciones de la microestructura de estas películas.

La Tabla 5 muestra los valores de índice de peróxidos de la grasa de cerdo recubierta con las diferentes películas después de 34 días de almacenamiento a 25°C y una humedad relativa de 53%. El IP inicial de las muestras fue de 2,16 meq O₂/kg grasa. Como cabría esperar, el IP de las muestras aumentó después de 34 días de almacenamiento pero no se observan diferencias significativas en el nivel de oxidación por efecto de la incorporación de los distintos aditivos. Coherentemente con los resultados de TEAC, el film con aceite esencial de albahaca ejerció cierto poder protector.

CONCLUSIONES

La incorporación de ingredientes activos en películas de WS:CH dio lugar a cambios microestructurales dependientes de la afinidad de los componentes. Los aceites esenciales y el ácido cítrico muestran una distribución homogénea mientras que el tocoferol da lugar a separación de fases. Las propiedades ópticas de las muestras se vieron afectadas por la incorporación de los ingredientes activos. Se observó un aumento en la transparencia, diferencias en el color (índice de blancura) y un descenso del brillo. Se detectaron cambios en las propiedades mecánicas de las muestras, siendo negativos cuando se incorpora ácido cítrico que da lugar a películas más frágiles y menos deformables. La adición de ingredientes activos dio lugar a una mejora de las propiedades barrera a los gases a 25°C, que no se tradujo en una reducción del nivel de oxidación de grasa de cerdo recubierta con las diferentes películas.

REFERENCIAS

- Ahn, J.H.; Kim, Y.P.; Seo, E.M.; Choi, Y.K. y Kim, H.S. (2008). Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering* 84, 327-334.
- Angellier, H.; Molina Boisseau, S.; Dole, P.; Dufresne, A.; (2006). Thermoplastic Starch-Waxy Maize Starch Nanocrystals Nanocomposites. *Biomacromolecules* 7, 531-539.
- ASME B46.1 (1995). Surface Texture: Surface Roughness, Waviness and Lay, An American National Standard. ASME, New York.
- ASTM. (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In standard D882. Annual book of American standard testing methods, (162-170). Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM (1995) Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designations: E96-95. Annual books of ASTM, ASTM, Philadelphia, (406-413).
- ASTM. (1999). Standard test method for specular gloss. In Designation (D523). Annual book of ASTM standards, Vol. 06.01. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM (2010). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor. Designations (3985-05).
- Atares, L.; Bonilla, J.; Chiralt, A.; (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678–687.
- Baldwin, E.A.; Nisperos, M.O.; Chen, X. y Hagenmaier R.D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology* 9, 15-163
- Bertuzzi, M. A.; Castro Vidaurre, E.F.; Armada, M; Gottifredi, J.C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering* 80(3), 972-978.

- Bonilla, J.; Atares, L.; Vargas, M.; Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 9-16.
- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (in press) (2012). Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering*
- Butler, B. L.; Vergano, P.J.; Testin, R.F.; Bunn, J.N.; Wiles, J. N. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science* 61, 953-955.
- 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.
- Guilbert, S.; Gontard, N. y Gorris, L.G.M. (1996). Prolongation of shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29 (1,2), 10-17.
- Gutiérrez, J.; Barry-Ryan, C. & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124, 91-97.
- Hutchings, J. B. (1999). *Food colour and appearance*. Maryland: Aspen Publishers.
- Kumar, M. N. V. R.; (2000). A review of chitin and chitonan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46(1), 1-27.
- Mc Hugh, T. H., Avena-Bustillos, R., y Krochta, J. M. (1993). Hydrophobic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Mc Hugh, T. H. (2002). Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung* 44 (3), 148-151.
- Osés, J., Fernández-Pan, I., Ziani, K. y Maté, J.I. (2008). Use of edible films based on whey protein isolate to protect foods rich in polyunsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology* 227, 623–628.
- Parra, D.F.; Tadini, C.C.; Ponce, P.; Lugão, A.B. (2004). Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers* 58, 475-481.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Reddy, Narendra ; Yang, Yiqi (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food chemistry* 118(3), 702 -711.
- R.N. Zúñigaa; O. Skurtysb; F. Osorioc; J.M. Aguileraa; F. Pedreschia; (2012). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: Effect of their microstructure. Fuente: *Carbohydrate polymers* 90(2), 1147 -1158.
- Sánchez-González, L.; Cháfer, M.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers* 82; 277-283.

- Shan, B.; Cai, Y.Z.; Sun, M.; Corke H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 7749-7759.
- Shen, X. L.; Wu, J. M.; Chen, Y.; Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids* 24(4), 285-290.
- Siripatrawan, U., Harte, B., (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 24, 770–775.