

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO
Departamento de Tecnología de Alimentos



**PROPIEDADES DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA
Y GELATINA. INCORPORACION DE ACEITES
ESENCIALES CON EFECTO ANTIFUNGICO.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Sandra Acosta Dávila

Dirigida por:

Chelo González Martínez

Maite Cháfer Nácher

Valencia, 2014



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

LA DRA. CHELO GONZALEZ MARTINEZ, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS, Y LA DRA. MAITE CHAFER NACHER PROFESORA TITULAR DE ESCUELA UNIVERSITARIA DEL MISMO DEPARTAMENTO,

CONSIDERAN: que la memoria titulada “PROPIEDADES DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA. INCORPORACION DE ACEITES ESENCIALES CON EFECTO ANTIFUNGICO”, que presenta Dña. Sandra Acosta Dávila, para aspirar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que **AUTORIZAN** a la interesada su presentación.

Valencia a 12 de Diciembre de 2013

Fdo.: Chelo González Martínez
Directora de la tesis

Fdo.: Maite Cháfer Nácher
Directora de la tesis

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directoras por su incondicional apoyo, por la confianza que han depositado en mí, por todo el tiempo que compartimos.

A cada uno de los profesores y personal Técnico del DTA, por su aporte en este camino de crecimiento.

A la Dra. Amparo Chiralt, que junto con mis directoras, me dio la bienvenida a esta casa de estudio, llenándome de ilusión y de ganas para comenzar este trabajo.

Al Gobierno del Ecuador, a su Presidente Rafael Correa al Ministerio de Educación con el programas de Becas Senescyt y muy especialmente a mi Universidad Politécnica del Litoral ESPOL, por el financiamiento y apoyo.

A mis compañeros y amigos del DTA, curiosa y alegre mezcla cultural entre España, Ecuador, Chile, Perú, México y Polonia, quienes me han acogido, apoyado y acompañado durante todos estos años llenando mis días con alegres momentos.

Y mis ex alumnos y a todos aquellos que han estado junto a mí durante este proyecto de vida y los que hoy ya no están...

*A mi País,
A mi Padre y Madre,
A Miguel, Nieves, Mónica
A mi familia y a mis amigos fraternos*

RESUMEN

El desarrollo de materiales de envase biodegradables activos es uno de los retos de la sociedad para resolver los problemas medioambientales asociados a los residuos plásticos y mejorar la conservación de los alimentos, alargando su vida útil. La presente tesis se centra en el desarrollo de films mixtos de almidón gelatina, con buenas propiedades funcionales, y la impartición de carácter bioactivo mediante la incorporación de aceites esenciales de corteza de canela, clavo y orégano, con probada actividad antimicrobiana. Se han caracterizado las propiedades microestructurales, de barrera al vapor de agua y al oxígeno, ópticas (brillo y transparencia) y mecánicas de films de almidón de yuca o gelatina de origen bovino con 25 % de glicerol, así como films mixtos con proporciones 50:50 y 75:25 de almidón: gelatina. Estos films se prepararon también incorporando un lípido (mezcla de mono y di glicéridos de ácidos grasos: E471) en proporción 1:0.15 polímero: lípido. En los films se analizó la cristalinidad, mediante difracción de rayos X, y las transiciones de fase por calorimetría diferencial de barrido. Las diferentes propiedades fueron analizadas a 1 y 5 semanas de almacenamiento de los films acondicionados a 25°C y 53% de humedad relativa. La incorporación de gelatina tuvo un efecto positivo sobre las propiedades mecánicas del almidón de yuca: los films ganaron dureza y resistencia a la fractura y con la proporción 50:50 se hicieron más extensibles. Los polímeros de almidón y gelatina no fueron compatibles y los films presentaron separación de fases,

mostrando zonas de asociación típicas de cadenas helicoidales de gelatina en una matriz amorfa, cuya temperatura de transición vítrea estuvo del orden de la encontrada para el almidón por otros autores. Todos los films se endurecieron y aumentaron su resistencia a la fractura a las cinco semanas de almacenamiento, aunque perdieron extensibilidad, salvo la formulación con 50 % de gelatina. El análisis de rayos X reveló la presencia de zonas cristalinas en los films de gelatina que aumentaron de tamaño durante el almacenamiento.

La incorporación del lípido a los films supuso una reducción de la permeabilidad al vapor de agua, pero una mayor permeabilidad al oxígeno, un incremento de la fragilidad, asociada a la presencia de una fase dispersa del lípido, y un descenso del brillo. También presentaron evolución de sus propiedades durante el almacenamiento. El grado de cristalización del lípido en los films fue muy bajo por el efecto de mezcla en la matriz.

La incorporación de aceites esenciales a la matriz mixta de almidón-gelatina 50:50, no introdujo cambios en las propiedades mecánicas de los films y redujo su permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno y el brillo. Así mismo, les impartió carácter antimicrobiano contra los hongos *Fusarium oxysporum*, y *Colletotrichum Gloeosporiodes*. Los ensayos in vitro revelaron la inhibición del crecimiento *Fusarium oxysporum*, especialmente con aceite de canela y de *Colletotrichum Gloeosporiodes*, en especial con el de clavo. La aplicación de los films bioactivos, como recubrimientos, en frutos de papaya inoculados con los dos hongos no reflejó efecto antifúngico, probablemente por el método

de secado utilizado, aunque sí que limitó la pérdida de humedad de la fruta durante el almacenamiento de siete días, sin afectar a la evolución de los parámetros de calidad.

SUMMARY

The development of biodegradable active packaging materials is one of the challenges of society in order to solve the environmental problems associated with plastic waste and improving food preservation, lengthening its shelf life. This thesis focuses on the development of melted gelatine-starch films with good functional properties, providing bioactive characteristics by adding essential oils from barks of cinnamon, clove and oregano, with proven antimicrobial activity. Film microstructure, and physical properties (water vapour and oxygen permeability, optical -gloss and transparency-, and mechanical properties) of films of cassava starch or bovine gelatine, with 25 % glycerol, as well as blend films with starch:gelatin ratios of 50:50 and 75:25, have been characterized. These films were also prepared incorporating a lipid (mixture of mono and diglycerides of fatty acids: E-471) in polymer: lipid ratio of 1:0.15. In the films, crystallinity was analysed, using X-ray diffraction, and phase transitions by differential scanning calorimetry. The different properties were analysed at 1 and 5 weeks of storage of the films conditioned at 25 °C and 53% of relative humidity. The addition of gelatine had a positive effect on the mechanical properties of cassava starch films, as they gained hardness and resistance to fracture and, for the 50:50 ratio, became more extensible. Polymers of starch and gelatine were not compatible and they presented phase separation, showing typical association areas of helical gelatine chains in an amorphous matrix, which glass transition temperature was within

the range of the one found for starch by other authors. All aged films were harder and more resistant to fracture after five storage weeks, although, except formulation with 50% gelatine, they become less extensible. X-ray analysis revealed the presence of crystalline regions in the gelatine films which increased in size during this storage period.

The incorporation of the lipid to these films resulted in a reduction of water vapour permeability, but in an increase in oxygen permeability and brittleness, associated with the presence of a dispersed lipid phase, and a decrease of brightness. They also showed development of their properties during storage. The crystallization degree of the lipid in the films was very low due to the more complex composition in the matrix.

Adding essential oils to the blend 50:50 starch-gelatine matrix did not change the mechanical properties of these films and reduced their water vapour and oxygen permeability and brightness. Likewise, it gave them antimicrobial properties against molds like *Fusarium oxysporum*, and *Colletotrichium gloeosporoides*. *In vitro* tests showed growth inhibition of *Fusarium oxysporum*, especially with cinnamon oil and *Colletotrichium gloeosporoides*, especially with clove oil. The application of bioactive films, as coatings, in papaya fruit inoculated with the two molds reflected no antifungal effect, probably because of the drying method of the coating. Nevertheless, it limited moisture loss of the fruit during seven days storage without affecting the development of quality parameters.

RESUM

El desenvolupament d'envasos biodegradables actius és un dels reptes de la societat per a resoldre problemes medioambientals associats als residus plàstics i millorar la conservació dels aliments, allargant la seua vida útil. La present tesi es centra en el desenvolupament de films mixtes de midó – gelatina, amb bones propietats funcionals, i la impartició de caràcter bioactiu mitjançant la incorporació d'olis essencials de corfa de canella, clau i orenga, amb provada activitat antimicrobiana. S'han caracteritzat les propietats microestructurals, de barrera al vapor d'aigua i a l'oxigen, òptiques (lluïentor i transparència) i mecàniques de films de midó de iuca o gelatina d'origen boví amb un 25% de glicerol, així como films mixtes amb proporcions 50:50 i 75:25 de midó:gelatina. Estos films es prepararen també incorporant un lípid (barreja de mono i diglicèrids d'àcids grassos: E-471) en proporcions 1:0.15 polímer:lípid. Als films es va analitzar la cristal·linitat, mitjançant la difracció de rajos X, i les transicions de fase per calorimetria diferencial de barreig. Les diferents propietats van ser analitzades a 1 i 5 setmanes d'emmagatzemament dels films acondicionats a 25°C i 53% d'humitat relativa. La incorporació de gelatina va tindre un efecte positiu sobre les propietats mecàniques del midó de iuca: els films van guanyar duresa i resistència a la fractura i amb les proporcions 50:50 es van fer més extensibles. Els polímers de midó i gelatina no van ser compatibles i els films van presentar separació de fases, mostrant zones d'associació típiques de

cadena helicoidal de gelatina en una matriu amorfa, la temperatura de transició vítria de la qual va ser de l'ordre de la trobada per a midó per altres autors. Tots els films es van endurir i augmentaren la seua resistència a la fractura a les 5 setmanes d'emmagatzemament, encara que van perdre extensibilitat, excepte en la formulació amb 50% de gelatina. L'anàlisi de rajos X va revelar la presència de zones cristal·lines als films de gelatina que van augmentar de tamany al llarg del l'emmagatzemament.

La incorporació del lípid als films va suposar una reducció de la permeabilitat al vapor d'aigua, però una major permeabilitat a l'oxigen, un increment de la fragilitat, associada a la presència d'una fase dispersa del lípid, i un descens de la lluentor. També presentaren evolució de les seues propietats al llarg de l'emmagatzemament. El grau de cristal·linitat del lípid en els films va ser molt baix per l'efecte de la barreja en la matriu.

La incorporació d'olis essencials a la matriu mixta de midó-gelatina 50:50, no va introduir canvis en les propietats mecàniques dels films i va reduir la seua permeabilitat al vapor d'aigua i a l'oxigen i la lluentor. Així mateix, els va impartir un caràcter antimicrobià front als fongs *Fusarium oxysporum*, i *Colletotrichium gloeosporoides*. Els assajos *in vitro* van revelar la inhibició en el creixement de *Fusarium oxysporum*, especialment en oli de canella i de *Colletotrichium gloeosporoides*, en especial en el clau. L'aplicació dels films bioactius, com a recobriments, en fruits de papaia inoculats en els dos fongs no va reflexar efecte antifúngic, probablement pel mètode de secar del recobriment, encara que si va limitar la pèrdua d'humitat de la fruita al llarg de

l'emmagatzemament de set dies, sense afectar a la evolució dels paràmetres de qualitat.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ANTECEDENTES EN FILMS Y RECUBRIMIENTOS	
COMESTIBLES BIODEGRADABLES	6
I.1.1. Componentes de los films biodegradables	6
I.1.2. Aplicación de recubrimientos biodegradables /comestibles	14
I.2. ESTUDIOS PREVIOS CON UTILIZACIÓN DE ALMIDÓN	15
I.2.1. Estructura y composición de los almidones	15
I.2.2. Cambios estructurales del almidón	17
I.2.2.1. Gelatinización y desestructuración	17
I.2.3. Métodos de obtención de los films de almidón	20
I.2.4. Propiedades y aplicaciones de films de almidón de yuca	23
I.3. ESTUDIOS PREVIOS CON UTILIZACIÓN DE GELATINA	28
I.3.1. Estructura y composición de la gelatina	28
I.3.2. Cambios estructurales de la gelatina	30
I.3.3. Propiedades y aplicación de films de gelatina	31
I.4. FILMS MIXTOS ALMIDÓN – GELATINA	36
I.5. FILMS DE BIOPOLIMEROS COMO VEHICULO DE ANTIMICROBIANOS	39
I.5.1. influencia de la incorporación de aceites esenciales en las propiedades de los films biodegradables	45
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	49
HIPÓTESIS	51
OBJETIVO GENERAL	52
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
PLAN DE TRABAJO	53
III. MATERIALES Y MÉTODOS	56
III.1. MATERIAS PRIMAS	58
III.1.1. Características de las materias primas	58
III.2. PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS FILMS	59
III.2.1. Films con almidón, gelatina y lípido	59
III.2.2. Films con almidón, gelatina y aceites esenciales	62
III.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS	64
III.3.1. Medida del espesor	64

III.3.2. Control de humedad	64
III.3.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	65
III.3.4. Permeabilidad al oxígeno (PO)	66
III.3.5. Propiedades mecánicas	67
III.3.6. Propiedades ópticas: brillo y transparencia	69
III.3.7. Microestructura	72
III.3.8. Difracción de rayos X	75
III.3.9. Análisis térmico (DSC)	76
III.3.10. Efectividad antifúngica en los films secos aislados	77
III.4. APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A LA CONSERVACIÓN DE PAPAYAS	80
III.4.1. Efectividad antifúngica de los recubrimientos	83
III.4.2. Calidad de papayas recubiertas	84
IV. CAPITULO 1	88
PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA- GELATINA	
IV.1.1. MICROESTRUCTURA	90
IV.1.2. PROPIEDADES ÓPTICAS Y BRILLO	99
IV.1.3. PROPIEDADES BARRERA	105
IV.1.4. PROPIEDADES MECÁNICAS	110
IV. CAPITULO 2	121
PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA – GELATINA	
IV.2.1. OBSERVACIONES MICROESTRUCTURALES	123
IV.2.2. ANÁLISIS TÉRMICO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	156
IV. CAPITULO 3	167
PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIFUNGICAS DE FILMS DE ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES	
IV.3. 1. MICROESTRUCTURA DE LOS FILMS	169
IV.3.2. PROPIEDADES BARRERA Y PÉRDIDAS DE ACEITE ESENCIAL DE LOS FILMS	175
IV.3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS	179

IV.3.4. PROPIEDADES ÓPTICAS	182
IV.3.5. PROPIEDADES ANTIFÚNGICA	184
IV. CAPITULO 4	191
APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACION DE PAPAYA	
I.4.1 CALIDAD DE PAPAYAS RECUBIERTAS	193
IV.4.1.1 Propiedades fisicoquímicas y pérdida de peso	193
IV.4.1.2. Color	198
IV.4.1.3. Firmeza	201
IV.4.2. EFECTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS RECUBRIMIENTOS	205
V. CONCLUSIONES	212
CAPITULO IV.1	214
CAPITULO IV.2	215
CAPITULO IV.3	216
CAPITULO IV.4	217
GENERALES	218
VI. BIBLIOGRAFÍA	219
ANEXOS	257
ANEXO 1. CAPITULO IV.4.2 COLOR	259
ANEXO 2. CAPITULO IV.4.1.3. FIRMEZA PAPAYAS SIN PIEL	263
ANEXO 3. CAPITULO IV.4.1.3. FIRMEZA PAPAYAS CON PIEL	267

INDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ESTRUCTURA HELICOIDAL DE LA GELATINA	29
I.2. REORGANIZACION DE LA GELATINA	31

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MOLDE DE TEFLÓN	61
III.2. FILM DE ALMIDÓN DE YUCA	62
III.3. DESECADORES EN CÁMARA A TEMPERATURA Y HUMEDAD CONTROLADA	64
III.4. COPAS EN DESECADOR Y EN ESTUFA A TEMPERATURA Y HUMEDAD CONTROLADA	66
III.5. EQUIPO PARA MEDIR PERMEABILIDAD AL OXIGENO OX-TRAN –MOCON	67
III.6. EQUIPO PARA MEDIR PROPIEDADES MECÁNICAS (PRENSA UNIVERSAL)	69
III.7. EQUIPO PARA MEDIR TRANSPARENCIA (ESPECTRO COLORÍMETRO MINOLTA	70
III.8. EQUIPO PARA MEDIR BRILLO (MULTI-GLOSS MINOLTA	72
III.9. EQUIPO PARA OBSERVAR MICROESTRUCTURAS JEOL®	73
III.10. EQUIPO PARA OBSERVAR MICROCOPIA DE FUERZA ATOMICA	75
III.11. EQUIPO DE MEDICIÓN DE CALORÍMETRIA DSC	77
III.12. CULTIVO DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPOROIDES</i> DE 7 DÍAS	78
III.13. CULTIVO DE <i>FUSARIUM OXYSPOURUM</i> DE 7 DÍAS	78
III.14. PLACAS CON SEMBRADO POR INCLUSIÓN, CON DE FILM CON ACEITE ESENCIAL	80
III.15. PAPAYAS EN ESTADO DE MADURACIÓN N° 2	81
III.16. CORTE DE PAPAYA EN ESTADO DE MADURACIÓN N° 2	81
III.17. PAPAYA A LAS 24 HORAS DE APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO	82

IV. CAPITULO 1

PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA- GELATINA

IV.1.1 MICROGRAFÍAS SEM DE LA SUPERFICIE DE	
---	--

FILMS DE ALMIDÓN Y GELATINA PUROS Y MIXTOS: SIN LÍPIDO (IZQUIERDA) Y CON LÍPIDO	92
IV.1.2 MICROGRAFÍAS SEM DEL CORTE TRANSVERSALES DE FILMS DE ALMIDÓN Y GELATINA PUROS Y MIXTOS: SIN LÍPIDO Y CON LÍPIDO	94
IV.1.3. ESFUERZO DE TENSIÓN (TS) VS DEFORMACIÓN DE HENKY (ϵ_H), DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA, PUROS Y MIXTOS, CON Y SIN ADICIÓN DE LÍPIDO	111
IV.1.4 MODULO DE ELASTICIDAD (ME), TENSION A LA FRACTURA (TS) Y EXTENSIBILIDAD (E) EN FUNCIÓN DEL PORCENTAJE DE GELATINA INCORPORADO A LOS FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA, CON Y SIN ADICIÓN DE LÍPIDOS	112

IV.CAPITULO 2

PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA –GELATINA

IV.2.1. DIFRACTOGRAMAS POR RAYOS X DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA, CON Y SIN ÉSTER	126
IV.2.2. DIFRACTOGRAMA OBTENIDO POR RAYOS X DEL LÍPIDO PURO	127
IV.2.3. MICROGRAFÍAS DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES OBTENIDAS POR SEM DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA (1500 AUMENTOS) SIN LÍPIDO	132
IV.2.4. MICROGRAFÍAS DE LAS SECCIONES TRANSVERSALES OBTENIDAS POR SEM DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA (1500 AUMENTOS) CON LÍPIDO	134
IV.2.5. MICROGRAFÍAS DE LA SUPERFICIE DE LOS FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA OBTENIDAS POR SEM (1500 AUMENTOS) SIN LÍPIDO	136
IV.2.6. MICROGRAFÍAS DE LA SUPERFICIE DE LOS FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA OBTENIDAS POR SEM (1500 AUMENTOS) CON LÍPIDO	138
IV.2.7 MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA (TAPPING MODE, 50 X 50 μ M) SIN LÍPIDO	144

IV.2.8. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA (TAPPING MODE, 50X 50µM) LÍPIDO	146
IV.2.9. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM (MODE PHASE 50 X 50µM) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA SIN LÍPIDO	148
IV.2.10. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM (MODE PHASE 50 X 50µM) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA CON LÍPIDO	150
IV.2.11. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM (PEAK FORCE MODE (LOGDMT) 30X30µM) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA SIN LÍPIDO	152
IV.2.12. MICROGRAFÍAS OBTENIDAS POR AFM (PEAK FORCE MODE (LOGDMT) 30X30µM) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA CON LÍPIDO	154
IV.2.13. TERMOGRAMAS TÍPICOS OBTENIDOS POR DSC DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA SIN LÍPIDO	162
IV.2.14. TERMOGRAMAS TÍPICOS OBTENIDOS POR DSC DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA CON LÍPIDO	164
IV.2.15. TERMOGRAMA CON LA CRISTALIZACIÓN DEL LÍPIDO	166

IV. CAPITULO 3

PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIFUNGICAS DE FILMS DE ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES

IV.3.1. OBSERVACIONES MICROESTRUCTURALES (SEM) DE LA SUPERFICIE Y SECCIÓN TRANSVERSAL DE FILMS ALMIDÓN-GELATINA (50S-50G), CON AE	173
---	-----

IV. CAPITULO 4

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACION DE PAPAYA

IV.4.1. PÉRDIDA DE PESO DE LAS PAPAYAS NO RECUBIERTAS Y RECUBIERTAS	
---	--

CON ALMIDÓN-GELATINA-ACEITES ESENCIALES	196
IV.4.2. PORCENTAJE DE FRUTOS AFECTADOS CON FOG Y CG EN PAPAYAS NO RECUBIERTAS Y RECUBIERTAS CON ALMIDÓN-GELATINA-ACEITES ESENCIALES	207

INDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

I.1. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS PARA FILMS DE ALMIDÓN DE	27
I.2. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTUDIOS CON FILMS DE GELATINA	35
I.3. FILMS CON INCORPORACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	42
I.4. APLICACIONES DE FILMS CON ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL MICROBIANO EN LA CONSERVACIÓN DE DIFERENTES FRUTOS	44

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES (AE)	59
---	----

IV. CAPITULO 1

PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA- GELATINA

IV.1.1 TRANSMITANCIA INTERNA (T_i) Y BRILLO 60° DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA, PUROS Y MIXTOS, CON Y SIN ADICIÓN DE LÍPIDO	100
IV.1.2 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA), PERMEABILIDAD AL OXIGENO (PO), HUMEDAD (X_w) Y ESPESOR (μM) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA, PUROS Y MIXTOS, CON Y SIN ADICIÓN DE LÍPIDO	106
IV.1.3 MODULO DE ELASTICIDAD (ME), TENSIÓN DE FRACTURA (TS) Y PORCENTAJE DE EXTENSIBILIDAD (E) DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA, PUROS Y MIXTOS, CON Y SIN ADICIÓN DE LÍPIDOS	114

IV. CAPITULO 2

PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA - GELATINA

IV.2.1. PARAMETROS DE RUGOSIDAD RQ (RUGOSIDAD MEDIA CUADRÁTICA), RA (RUGOSIDAD PROMEDIO) DE LOS FILMS DE ALMIDÓN DE YUCA Y GELATINA BOVINA SIN Y CON LIPIDO	141
IV.2.2. TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA (TG) DE LAS DIFERENTES MATRICES OBTENIDAS POR DSC A TIEMPO INICIAL DE ALMACENAMIENTO	159
IV.2.3. TEMPERATURA DE FUSIÓN DEL LÍPIDO (INICIAL, MEDIA Y FINAL) Y ENTALPIA DE FUSIÓN PARA LAS DISTINTAS FORMULACIONES CON LÍPIDO	160

IV. CAPITULO 3

PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIFUNGICAS DE FILMS DE ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES

IV.3.1. PROPIEDADES BARRERA AL VAPOR DE AGUA Y AL OXÍGENO DE LOS FILMS Y PÉRDIDA DE ACEITE ESENCIAL EN FILMS ALMIDÓN-GELATINA (50:50), CON AE	176
IV.3.2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS FILMS ALMIDÓN-GELATINA (50S-50G), CON Y SIN AE	180
IV.3.3. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS FILMS ALMIDÓN-GELATINA (50:50), CON AE	183
IV.3.4. HALO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>FUSARIUM OXYSPOURUM</i> (FOG) Y <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPOROIDES</i> (CG) DE LOS DIFERENTES FILMS CON AE	186

IV. CAPITULO 4

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACION DE PAPAYA

IV.4.1. COMPOSICIÓN EN SÓLIDOS SOLUBLES, HUMEDAD Y ACIDEZ DE LAS PAPAYAS, RECUBIERTAS Y NO RECUBIERTAS	197
--	-----

IV.4.2. COORDENADAS DE COLOR DE LAS PAPAYAS, RECUBIERTAS (RC) Y NO RECUBIERTAS, ANTES (0) Y DESPUÉS DE SU ALMACENAMIENTO (6 DÍAS) EN CONDICIONES AMBIENTE	200
IV.4.3. FIRMEZA DE LAS PAPAYAS SIN PIEL, RECUBIERTAS Y NO RECUBIERTAS, ANTES Y DESPUÉS DE SU ALMACENAMIENTO EN CONDICIONES AMBIENTE EXTREMO Y CENTRO DEL FRUTO	202
IV.4.4. FIRMEZA DE LAS PAPAYAS CON PIEL, RECUBIERTAS Y NO RECUBIERTAS, ANTES Y DESPUÉS DE SU ALMACENAMIENTO EN CONDICIONES AMBIENTE EXTREMO Y CENTRO DEL FRUTO	204

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los retos actuales de nuestra sociedad es minimizar el impacto ambiental de los materiales utilizados, y la reducción de residuos cuyo reciclado supone un alto coste. En este sentido, se hace cada vez más necesario la utilización de materiales biodegradables en distintos ámbitos industriales de producción, elaboración, manipulación, comercialización y transporte. En particular, la conservación de alimentos implica un alto consumo de materiales de envase. En los últimos años se han realizado un gran número de investigaciones orientadas a la formulación de films y materiales de envasado biodegradables a partir de diferentes biopolímeros, casi siempre combinados con otros componentes de origen natural que modulan sus propiedades. El mercado tiene una gran demanda de este tipo de productos, no solo por el volumen de consumo, sino por la diversidad de los alimentos procesados con diferencias relevantes en cuanto a sus necesidades de conservación: composiciones diferentes e interacciones alimento-envase diversas. La gran carga de envases no degradables en el medio ambiente y en particular los derivados del petróleo denominados “plásticos” han incrementado la contaminación, con altos costos energéticos para su recolección y eliminación, lo que hace necesaria la investigación en alternativas que disminuya el actual impacto ambiental (Bastioli, 1998; Demecheli, 2000; Matzinos et al., 2000; Tharanathan, 2003; Ruiz, 2006; Villada et al., 2007).

En el ámbito de envases para alimentos, el desarrollo de envases activos con propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes representa un reto importante, ya que permiten alargar la vida útil del producto, mejorando su calidad y seguridad. Esto representa grandes beneficios para la industria de alimentos y para el consumidor (Bastiolo, 2001). Entre los biopolímeros utilizados en la formulación de materiales de envase biodegradables se encuentran los polisacáridos y algunas proteínas de fuentes naturales que están disponibles en el mercado. De entre los polisacáridos, los derivados de celulosa, quitosano, y almidones son los más representativos en este tipo de aplicaciones. La proteína de soja, las de origen lácteo y proteína de guisante son las utilizadas (Cuq et al., 1998; Fama et al., 2003).

El almidón, presente en un gran número de vegetales (tubérculos, legumbres, semillas o cereales) forma parte del consumo humano, aportando en valor energético del 70 - 80%, de la dieta. Su concentración en el material vegetal depende de la variedad, origen y estado de madurez (Cuq et al., 1998; Thomas y Atwell, 1999). Su alta disponibilidad en el mercado, su bajo coste y capacidad para formar films plásticos le convierte en un material interesante para la obtención de materiales de envase (Villada et al., 2007). No obstante, los films de almidón poseen una excesiva fragilidad, alta higroscopicidad y envejecen con el tiempo debido a fenómenos de retrogradación (García et al., 2004; Chang et al., 2006; Zhou et al., 2011). La mezcla de almidón con otros biopolímeros, plastificantes o nanopartículas se ha venido estudiando para mejorar las propiedades de los films de almidón

(Fama et al., 2003; Matsui et al., 2004; Souza et al., 2012). Estas mezclas dependiendo de las cualidades de los componentes puede presentar ventajas, en cuanto a las propiedades físicas: como las de barrera al vapor de agua y al oxígeno, las propiedades; mecánicas, ópticas y de transparencia (Cuq et al., 1998; Wang et al., 2003; Averous y Boquillon, 2004; Ruíz, 2006; Villada et al., 2007). No obstante, son necesarios más estudios que permitan poner en el mercado material competitivos en precio y propiedades para la fabricación de envases alimentarios biodegradables y seguros y eliminar las actuales barreras que hasta el momento limita su uso y aplicación.

La presente tesis se centra en el desarrollo de films a base de almidón de yuca y gelatina, con o sin lípidos (ésteres de mono y di glicéridos de ácidos grasos) y la caracterización de sus propiedades físicas y estructurales en aras a identificar las formulaciones que presentan las propiedades más adecuadas como material de envase para alimentos. Por otro lado, la incorporación de agentes activos como antioxidantes y antimicrobianos se consideró para las formulaciones almidón-gelatina más adecuadas. Como agentes activos se incorporaron aceites esenciales de orégano, clavo y corteza de canela. Las formulaciones bioactivas se aplicaron para analizar su actividad conservante en frutos de papaya.

I.1. ANTECEDENTES EN FILMS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES BIODEGRADABLES.

I.1.1. Componentes de los films biodegradables

Los films biodegradables, acuñados con el nombre de biopolímeros, tienen aplicaciones en la agroindustria de envasado, y también, en muchos casos se aplican como recubrimientos comestibles para productos alimentarios¹. Estos biopolímeros pueden ser de origen marino (extractos de algas), agrícola (almidón o goma de garrotín) y microbiano (goma de xantán) (Tharanathan 2003; Wang et al., 2003; Ruiz, 2006). Entre ellos, los almidones presentan la particularidad de exhibir propiedades termoplásticas después de la gelatinización lo que ofrece gran interés porque pueden ser procesados por las técnicas de plásticos convencionales implementadas en la industria (Lawton, 1996).

Sobre los años 70, se iniciaron las investigaciones sobre aplicación de recubrimientos con biopolímeros, definiéndolos como estructuras complejas con diversidad funcional (Villada et al., 2007).

¹(Films y recubrimientos son términos equivalentes, aunque comúnmente se emplea el termino recubrimiento, cuando se aplica el film sobre una superficie o alimento).

En la actualidad se obtienen films/recubrimientos con diferentes características de dureza, flexibilidad, transparencia, resistentes a las grasas y aceites, con buena barrera a los gases, y elevada permeabilidad al vapor de agua, (Kester y Fennema, 1986), pudiendo modularse sus propiedades físico-químicas mediante mezcla con otros compuestos (Vargas et al., 2008).

La mayor parte de las investigaciones con biopolímeros se han centrado en el uso de polisacáridos, proteínas y con incorporación de algunos lípidos.

POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos se utilizan en diversos campos industriales, como la industria farmacéutica, la industria química, la tecnología de alimentos (Cuq et al., 1998; Durango et al., 2009; Jiménez et al., 2012). En el ámbito alimentario se utilizan como estabilizantes o agentes impartidores de textura o consistencia por lo que son ampliamente usados. (Zhao y Whistler, 1994). Además su costo no es elevado y tienen alta biocompatibilidad, (Iqbal et al., 2011). Una de las más antiguas aplicaciones de recubrimientos data el siglo XII, donde los chinos, aplicaban cera a las naranjas y limones para aumentar su vida útil (Hardenburg, 1967), al limitar la pérdida de agua durante el almacenamiento. En la actualidad se aplican, en forma de emulsión con biopolímeros, sobre la superficie. Una vez seca, queda una fina película sobre el producto, dándole protección, (Gennadios y Weller, 1990; Krochta et al., 1994; Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008).

Cuando a los biopolímeros se les adiciona agua, forma los denominados hidrogeles, que son redes tridimensionales hidrófilas que retienen grandes cantidades de agua, de consistencia diferente, dependiendo de la temperatura, con carácter viscoelástico y estructura semicristalina, (Ruiz, 2006).

Actualmente entre los polisacáridos más estudiados están los almidones sin o con gelatinización por diferentes procesos industriales (Benavides, 2002; Srinivasa et al., 2004; Parra et al., 2004; Blacido et al., 2005). La celulosa, amilosa, quitosano, carboxilo metil celulosa CMC, hidroxipropil metilcelulosa HPMC, metil celulosa MC, extractos de algas, pectina y gomas se encuentran también entre los más usados, (Baldwin et al., 1995).

Numerosas investigaciones colocan al quitosano, solo o en combinación con otros compuestos, como uno de los polisacáridos de mayor aplicación, ya que da lugar a films flexibles, duros y transparentes, insolubles al agua, con muy buenas características para ser cobertura de frutas o vegetales, (Benavides, 2002; Srinivasa et al., 2004; Hagenmaier, 2005).

En otros estudios, buscando el incremento de la resistencia del film, se combinó el quitosano con fibras de bagazo de yuca o con residuos de papel kraft, dando como resultado films con alta resistencia, para ser usados como contenedores rígidos para huevos, frutas y verduras (Matsui et al., 2004).

PROTEÍNAS

Los films con base de proteína forman buenas coberturas, siendo una buena barrera al oxígeno y al dióxido de carbono, pero no al vapor de agua debido a su naturaleza hidrófila (Baldwin et al., 1995; Ryu et al., 2002; Wang et al., 2003). Los diferentes tipos de proteínas presentan diversidad en sus características finales, en función de su peso molecular, carga eléctrica, con formación helicoidal u ovillo y la estabilidad térmica (Vargas et al., 2008), además de poseer propiedades emulsificantes intrínsecas (Leman y Kinsella, 1989; Callegarin et al., 1997).

Una de las proteínas más utilizadas en los estudios de films y recubrimientos es la zeína, que es una proteína del maíz, que además de su capacidad para formar films, es utilizada como suplemento nutricional (Baldwin et al., 1995). Otras proteínas utilizadas son el gluten, soja, albumina de huevo, colágeno, gelatina, suero de leche y caseinatos (Baldwin et al., 1995; Ryu et al., 2002; Wang et al., 2003).

Dentro de las proteínas con mayor aplicación está la gelatina que proviene de la hidrólisis del colágeno, con buena capacidad formadora de films comestibles. La gelatina forma films flexibles y resistentes (Johnson et al., 2001) y, por sus características, se puede combinar con lípidos dando films resistentes y con baja permeabilidad al vapor de agua.

LÍPIDOS

Esta clasificación incluyen a los aceites, grasas, ceras, mono y di glicéridos acetilados, triglicéridos, ácidos grasos, alcoholes grasos, lecitinas, esteres de la sacarosa, lacas, barnices y resinas naturales (Morillon et al., 2002). Son los más usados para combinarse con otros componentes formadores de films ya que carecen de capacidad para formar films por si solos. No obstante, combinados con biopolímeros, dan lugar a films con mejores propiedades.

Siendo los lípidos buena barrera para la humedad, los biopolímeros no lo son y, por tanto, su mezcla permite la modulación de esta propiedad. Cuando se forman films de biopolímeros, estos aportan brillo, buena barrera al O₂ y al CO₂, pero no son buena barrera al vapor de agua, (Cho y Rhee, 2002; Tangpasuthadol et al., 2003). La incorporación de lípidos, permite incrementar este poder barrera (Donhow y Fannema, 1994; Guilbert et al., 1996).

Entre las aplicaciones más antiguas de los recubrimientos en alimentos está el uso de las ceras parafinadas y ceras de candelilla por ser buena barrera a gases y vapor de agua, para frutas (Debeaufort et al., 2000; Tharanathan, 2003). También las lacas tienen la misma aplicación (Gamagae et al., 2004).

OTROS ORIGENES

Se pueden formar films a partir de biopolímeros obtenidos por fermentaciones microbianas o biosíntesis bacteriana, los cuales deben de reunir requisitos mínimos de transparencia, baja permeabilidad, flexibilidad, dureza y brillo (Baldwin, 1994; Debeaufort et al., 1998).

Dentro de esta clasificación están los poliésteres termoplásticos obtenidos a partir de la fermentación bacteriana de la glucosa, como el polihidroxiбутирато (PHB), que se puede usar solo o combinado con plásticos o almidones, dando excelentes films, con aplicaciones en el envasado con atmosferas controladas ya que acumulan CO₂ (Tharanathan, 2003). La *Pseudomonas aeruginosa*, forma un biopolímero que tiene aplicación para cobertura en frutas y verduras (Fernández et al., 2005). El pullulan es otro polímero utilizado, que es secretado por el *Aureobasidium pullulans* (Lazaridou et al., 2003). Se puede obtener también el ácido poliláctico (PLA) por fermentación bacterianas, así como los polihidroxiácidoalcanoatos (PHA) por la acción de *Pseudomonas aeruginosa* (Tharanathan, 2003; Villada et. al., 2007; Villada et al., 2008).

COMBINACIÓN DE COMPONENTES. TENDENCIAS

Los films biodegradables obtenidos a partir de proteínas o polisacáridos, pueden formarse con combinación de componentes para obtener matrices con propiedades mejoradas. Cada uno de

estos compuestos aporta propiedades específicas a los films. En este sentido la incorporación de lípidos (ceras, ácidos grasos, esteroides, etc.) o combinaciones de estos es una estrategia para mejorar las propiedades barrera al vapor de agua (García et al., 2000a; Cao et al., 2007; Fabra et al., 2011; Fabra et al., 2012; Jiménez et al., 2012; Jiménez et al., 2013). En general, las proteínas y polisacáridos aportan a los films buenas propiedades mecánicas y barreras a los gases (Arvanitayannis y Psoniadu, 1996) pero pobre barrera al vapor de agua (Guilbert et al., 1996). Con el propósito de obtener una matriz con características y funciones específicas, se adicionan también otros componentes como emulsificantes, antioxidantes, conservantes, nutrientes, vitaminas, inhibidores del crecimiento de microorganismos, colorantes, saborizantes, fortificadores de alimentos, especias, etc. (Jhonson et al., 2001; Pranoto et al., 2005; Famá et al., 2007; Shen et al., 2010). La formación de films activos consiste en incorporar a las matrices poliméricas compuestos con actividad específica: antioxidante o antimicrobiana, lo que permite, a través de su liberación controlada una mejor conservación de los alimentos, alargando su vida útil (Sánchez-González et al., 2011; Perdones et al., 2012; Pastor et al., y 2013).

En la conservación de los alimentos hay sustancias capaces de ser usadas como agentes antimicrobianos, de origen natural. De las plantas se pueden obtener aceites esenciales por diferentes mecanismos a partir de las hojas, cortezas y flores, que químicamente son hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, esteroides, éteres, y fenoles. (Ponce et al., 2008). Estos compuestos

pueden ser adicionados a los films biodegradables de diferente origen, con el objetivo de mejorar la conservación de los alimentos. Por ejemplo, inhibiendo la acción de enzimas peroxidasa y polifenoloxidasas (Quintavalla y Vicini, 2002; Ponce et al., 2008; Emiriglua et al., 2010), en dosis pequeñas (Min y Krochta, 2005) o de microorganismos (Sánchez-González et al., 2011).

La aplicación de estos compuestos debe mantener las características sensoriales y nutricionales del alimento (Hemeda y Klein, 1990; Sebranek, 2004; Ponce et al., 2008). Su incorporación en films o recubrimientos provoca cambios en las características finales de los films en cuanto a su permeabilidad, propiedades mecánicas, ópticas y de brillo. (López-Rubio et al., 2004; Oussalah et al., 2004; Gómez-Estaca et al., 2007). En la actualidad existen numerosos estudios de aplicación de aceites esenciales en films y recubrimientos y estudios de su actividad antimicrobiana, *in vitro* e *in vivo* (Sánchez-González et al., 2011).

Como ejemplo, en estudios *in vitro* con films de gelatina y aceites esenciales de bergamota y limón sobre las bacterias: *Escherichia coli*, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Salmonella*, se encontró una mayor inhibición con el aceite esencial de limón (Peredes et al., 2011; Mehraj et al., 2012). Como ejemplo de estudios *in vivo*, a films de almidón de yuca con gelatina, se adicionó aceites esenciales de: pimienta roja, miel de propolis, extracto de propolis, polvo de café, esencia de naranja, canela y de clavo, como recubrimiento en rebanadas de pan blanco. El análisis final indicó que el aceite de canela es el que menos cambios dio en la

estructura del film y conservo mejor el pan durante 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Kechichian et al., 2010).

Muchos de los aceites esenciales están clasificados como compuestos GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration, EEUU) por lo que en su aplicación en films pueden estar en contacto con los alimentos (Persico et al., 2009).

I.1.2. Aplicación de recubrimientos biodegradables-comestibles

Los denominados recubrimientos comestibles biodegradables de biopolímeros naturales, deben retardar la pérdida de agua y de peso de los alimentos, evitar o disminuir el intercambio gaseoso, mantener la calidad, sin cambios de pH, mantener la firmeza de la piel y minimizar la tasa de respiración en frutas y vegetales, que termina en la fermentación y podredumbre (Kester y Fennema, 1986; Baldwin et al., 1995; Park, 1999; Jingyun et al., 2011).

Los revestimientos utilizados pueden ser de diferente tipo: polisacáridos, proteínas, lípidos. Deben ser comestibles, con buena apariencia estética, buena barrera al oxígeno y al vapor de agua (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). Una de las coberturas con características bactericidas y fungicidas es el quitosano, (Quattara et al., 2000; Geraldine et al., 2008), con gran potencial en la conservación de fresas y frambuesas (Park et al., 2005; Vargas et al., 2006), mango en rodajas (Chien et al., 2005),

cítricos (Fones et al., 2005), castañas cortadas (Pen y Jiang, 2003).

En estudios de comparación de diferentes coberturas biodegradables, llegaron a la conclusión, de que cada biopolímero aporta características diferente frente al alimento. En estudios con diferentes frutas y vegetales: arándanos, kiwis, cerezo, calabaza, piña, manzanas, patata, apio y fresas, a las que se les aplicaron diferentes coberturas como: sucroésteres de ácidos grasos, quitosano soluble en ácido, quitosano soluble en agua, caseinato de calcio y alginato sódico. De este estudio se llegó a la conclusión de que el quitosano reduce la tasa de decadencia a temperatura de ambiente, el sucroéster de ácido graso redujo la pérdida de peso y los caseinatos de calcio y alginato sódico fueron buena barrera al oxígeno, retrasando la maduración de la fruta y manteniendo la firmeza. (Park, 1999; Letien et al., 2000; Yaman y Bayoindirli, 2002; Kaynas et al., 2002; Vachon et al., 2003; Nimitkeatkai et al., 2006 ; Fisk et al., 2008; Avena- Bustillos et al., 2011; Jingyun et al., 2011).

I.2. ESTUDIOS PREVIOS CON UTILIZACIÓN DE ALMIDÓN

I.2.1. Estructura y composición de los almidones

Dentro de los polisacáridos los que más potencial de uso y aplicaciones tienen, por su alta disponibilidad y bajo coste son los almidones. Los films de almidón presentan muy baja

permeabilidad al oxígeno. (Dole et al., 2004), pero presenta la desventaja de ser muy hidrófilicos y de tener pobres propiedades mecánicas. Los almidones durante el envejecimiento re-asocian sus moléculas en estructuras que dependen de las condiciones de almacenamiento humedad y temperatura (Rindlav et al., 1998), produciéndose el proceso llamado retrogradación, que cambia sus características iniciales.

La estructura del almidón consiste en dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), en el cual pueden estar presentes algunos enlaces α (1-6). Esta molécula es soluble en agua, formando micelas hidratadas por su capacidad para formar puentes de hidrógeno, generando una conformación helicoidal (Knutzon y Grove, 1994). La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4), y en un 4-6% con uniones α (1-6). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15 o 25 unidades de glucosa. La característica principal de la amilopectina, es que es sólo parcialmente soluble en agua caliente (Guan y Hanna, 2004; Hernández-Medina et al., 2008).

Los gránulos de almidón son un sistema polimérico semicristalino, donde la cristalinidad varía de 15 a 45%, y es atribuida a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, que forman dobles hélices, organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Zobel, 1988; Eerling y Delcour, 1995). Según su origen, varía el tipo cristalinidad de los almidones: tipo A (cereales), tipo B

(raíces) y tipo C (leguminosas) (Myllarinen et al., 2002; Novamont, 2007).

Las propiedades comercialmente significativas del almidón, tales como su resistencia mecánica y flexibilidad, dependen de la resistencia y carácter de la región cristalina, en función de la relación de amilosa y amilopectina, y por lo tanto del origen del almidón, de la distribución de pesos moleculares, del grado de ramificación y de la conformación de cada componente de polimérico (Ruiz, 2006).

I.2.2. Cambios estructurales del almidón

I.2.2.1. Gelatinización y desestructuración

En la formación de films de almidón se producen dos fenómenos la gelatinización y la desestructuración. La gelatinización, se define como la pérdida de la cristalinidad de los granos de almidón, en presencia de calor y altas cantidades de agua, con muy poca o ninguna despolimerización. En el proceso de gelatinización, el orden molecular dentro de los gránulos es destruido gradual e irreversiblemente. Esto hace que la temperatura de gelatinización sea característica para cada tipo de almidón y se relaciona principalmente, con la temperatura de transición vítrea de la fracción amorfa del almidón (Eerlinger y Delcour, 1995; Hernández-Medina et al., 2008). Por lo tanto la gelatinización ocurre a diferentes temperaturas para cada tipo de

almidón, (Tan et al., 2004; Ratnayake y Jackson, 2007; Ronda y Roos, 2008).

El proceso de gelatinización, puede darse también en frío (sin aplicación de calor) mediante tratamiento con NaOH (Romero-Bastida et al., 2005). Estudios estructurales comparativos, mediante SEM, muestran diferencias en la estructura de los films obtenidos por el método en frío respecto a los obtenidos con la gelatinización térmica. En la gelatinización en frío se observa una estructura agrietada, mientras que en caliente la matriz es homogénea. Esto se relaciona también con la resistencia mecánica de los films que es menor en el método de gelatinización en frío, que también da lugar a una menor barrera al vapor de agua.

Durante la gelatinización el agua penetra inicialmente en las regiones amorfas produciéndose el hinchamiento del gránulo y va asociado a una disminución de la birrefringencia. Luego el agua difunde de las cadenas de almidón a la superficie de los cristales a medida que la temperatura aumenta, provocando la movilidad térmica de las moléculas y su solvatación, favorecida por las fuerzas de hinchamiento. Todo ello provoca una disminución de la cristalinidad, por el desenrollado de las dobles hélices, hasta que la estructura granular es fragmentada casi completamente, obteniéndose una solución-gel. (Ruiz, 2006).

Siendo así, la gelatinización de los almidones implica, la hidratación, la difusión del disolvente en los gránulos de almidón y la fusión de los cristales de almidón (Donovan, 1979; Jenkins y

Donald, 1998). En el proceso de gelatinización ocurre que el orden molecular, y por lo tanto la birrefringencia, se pierden y los gránulos pierden su cristalinidad, absorben gran cantidad de agua, provocando el hinchamiento y un aumento en su volumen. Se solubilizan algunas moléculas, particularmente la amilosa, que se difunde al agua y, si el calentamiento continúa, se rompen los gránulos y se observa una solubilización parcial. Todo este proceso es endotérmico, como lo han demostrado los estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (Biliaderis y Juliano, 1993). La pasta de almidón obtenida después de la gelatinización no es estable, porque en el almacenamiento se producen transformaciones estructurales que constituyen la llamada retrogradación.

La formación de films de almidón requiere de la gelatinización previa para la liberación de los polímeros del gránulo y su re-asociación para formar la matriz del film. Una vez terminado el proceso de gelatinización el siguiente paso para la formación de un film, es la homogenización, con equipos como un rotor- estator, (Jiménez et al., 2012) o viscografo Brabender (Petersson y Stading, 2005), siendo este paso de mucha importancia sobre todo si la formulación contiene otros componentes. (Wongsasulak et al., 2006).

En la formación de films de almidón se produce la desestructuración del gránulo, que es el proceso de transformación del almidón semicristalino, en una matriz homogénea de polímero con la ruptura de los puentes de hidrogeno entre las moléculas de almidón y la despolimerización

parcial de las moléculas. La amilopectina se despolimeriza inicialmente y luego la amilosa con la aplicación de mayor energía. (Cuq et al.1997b; Gaudin et al., 1999 ; Ruiz et al., 2006; Chang et al., 2006). La desestructuración también puede ocurrir cuando se aplica calor. El aumento de temperatura incrementa la solubilidad del almidón en agua produciéndose una despolimerización significativa alrededor de los 150°C, sin embargo, solamente por encima de 190°C puede confirmarse el incremento de la solubilidad. Cuando se aumenta el contenido de humedad de la mezcla disminuye el grado de desestructuración (Ruiz, 2006).

I.2.3. Métodos de obtención de los films de almidón

Los films de almidón se pueden obtener por dos métodos, vía húmeda y vía seca (Romero-Bastidas et al., 2005). En el primero se ha de preparar una dispersión de almidón y someterla a calentamiento para inducir la gelatinización. La dispersión gelatinizada se extiende sobre una superficie nivelada (casting) y se seca en condiciones controladas de humedad y temperatura. El almidón gelatinizado tiene propiedades termoplásticas (TPS) y puede, por tanto, tratarse como otros termoplásticos para la obtención de films por vía seca (Pagelle et al., 2002). Cuando se trata de procesos en seco, se usan materias primas de propiedades termoplásticas que puedan ser moldeados, por procesos térmicos o mecánicos con la ayuda de plastificantes, para que los materiales obtenidos no presenten fragilidad a

temperatura de ambiente (Forsell et al., 1997). Cuando el almidón se mezcla con otros materiales biodegradables, los films obtenidos pueden ser compatibles con el medio ambiente, y se les puede incorporar como abono orgánico al sistema (Bastiolo, 2001; Ruiz et al., 2009).

Los TPS, se pueden procesarse con los equipos estándar utilizados para polímeros sintéticos tales como inyección por moldeo, extrusión por soplado, moldeo por inyección, moldeo por compresión, extrusión de película plana, y radiación por soplado (Van Soest et al., 1996b; Zhai et al., 2004), y últimamente se ha obtenido por atomización electro hidrodinámica EHDA, proceso que utiliza el almidón y el plastificante mezclados y los hace pasar a través de un capilar con aplicación de diferencias de potencial (Pareta y Edirisinghe, 2006).

Cuando se trata el almidón termoplástico, por procesos de extrusión, moldeo por presión o moldeo por inyección, se utiliza agua como plastificante en proporción por debajo del 20%. (Ruiz, 2006; Acosta et al., 2007), siendo necesario romper y fundir la estructura semicristalina del almidón, para obtener el almidón termoplástico (Van Soest y Essers, 1997). Los almidones con este procesado termoplástico presentan mayor al oxígeno y menor permeabilidad al vapor de agua (Forsell et al., 2002).

Las formulaciones pueden variar de 50 al 90% de almidón y entre el 50 y el 10% de aditivos plastificantes además pueden modificarse las condiciones mecánicas y térmicas durante el proceso de la termoplastificación (Van Soest y Essers, 1997).

En estudios realizados por diferentes autores (Ma et al., 2005; Brodos et al., 2007) se han usado fibras de diferentes orígenes hasta en un 30% en los almidones termoplásticos para mejorar la resistencia mecánica, demostrando que la fibra reduce el envejecimiento y mejora las propiedades mecánicas y de barrera de los films.

En la preparación de films a partir de almidón es crucial la adición de plastificantes que faciliten el flujo y aumenten la flexibilidad del film, aumentando su resistencia a la rotura (Sothornvit y Krochta, 2005; Habitante et al., 2008). Para este fin se utilizan polialcoholes como el glicerol, sorbitol, manitol, sacarosa, azúcar invertido, propilenglicol y polietilenglicol (Gontard et al., 1993; Mali et al., 2005). Como se ha comentado, estos plastificantes se adicionan para disminuir la fragilidad de los films, causada por las altas fuerzas intermoleculares en la matriz. Con ello, se incrementa la flexibilidad de los films, debido a su capacidad para reducir los enlaces de hidrogeno internos, entre las cadenas del polímero, aumentando el volumen molecular. Su incorporación afecta a la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, reduce los valores del módulo de Young, además hace que los films se han mas estirables y flexibles debido al aumento de la movilidad de las cadenas del polímero (Banker, 1966; Sothornvit y Krochta, 2001; Mali et al., 2006).

En estudios de comparación de varios almidones con la adición del glicerol, este observó que las propiedades térmicas, mecánicas y de barrera en films de almidón de maíz, yuca y ñame cambiaron en presencia de glicerol. La permeabilidad al

vapor de agua fue mayor y el valor de la temperatura de transición vítrea, T_g , disminuyó (Tharanathan, 2003). Como contraparte otros estudios no atribuyen sólo al plastificante estos efectos sino a los procesos de cristalización y re-cristalización del almidón (Vanin et al., 2005; Mali et al., 2006). En estudios posteriores, con almidón de yuca y gelatina de pez, se determinó que el glicerol era el mejor plastificante por su alta capacidad para interactuar con el agua (Hassan y Norziah, 2012).

1.2.4. Propiedades y aplicaciones de films de almidón de yuca.

Sobre el almidón de yuca, se han realizado diversos estudios enfocados a la obtención de mezclas con diferentes polímeros, sintéticos o biodegradables, determinando sus propiedades físicas. (Kiatkamjornwong et al., 1999; Kaewtatip y Tanrattanakul, 2008; Salgado et al., 2008). En la tabla I.1 se recogen algunas de los estudios sobre films de almidón de yuca con otros componentes.

Hernández-Medina et al., 2008, hicieron una evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los almidones de makal, camote, yuca y sagú, llegando a determinar que el almidón de yuca presento mayor poder de hinchamiento (Cheng et al., 1996; Moorthy, 2002), elasticidad y capacidad de absorción de agua, siendo muy adecuado para la obtención de films (Guisjka et al., 1994; Bello-Pérez, 1995; Novelo y Betancur, 2005).

En estudios más recientes, Sánchez et al. (2010) con almidones de patata, maíz, arroz y yuca nativo y no ceroso, determinaron que los geles de almidón de yuca ceroso (sin contenido de amilosa) no presentaron sinéresis en el almacenamiento de 5 semanas a -20°C., lo cual es una propiedad de gran interés para su aplicación en alimentos procesados.

Reolon et al. (2013) observaron que al adicionar ácido esteárico al almidón de yuca, utilizando glicerol como plastificante, las propiedades mecánicas y de permeabilidad, mejoraron con respecto a las del film control sin ácido esteárico. Se observó también una disminución de la solubilidad y de la permeabilidad al vapor de agua. La combinación más adecuada para la elaboración de films por casting se estableció en 4 g de ácido esteárico y 24 g de glicerol/100 g de almidón seco, asegurando así las mejores propiedades mecánicas y de permeabilidad.

Su et al., 2010 y Souza et al., 2012, encontraron que el glicerol y diferentes azúcares fueron compatibles con el almidón de yuca, mejorando su flexibilidad y evitando la formación de fracturas durante la manipulación del film, pero disminuyeron mucho su poder barrera, el cual mejoró con la adición de nanopartículas de arcillas. En su trabajo, proponen la incorporación de estas nanopartículas en procesos de extrusión para favorecer la completa delaminación de las partículas, con efecto positivo sobre las propiedades mecánicas y de barrera del film.

Tongdeesoontom et al. (2011), trabajando con carboximetilcelulosa CMC, observaron que al aumentar la concentración de la CMC en films de almidón de yuca, aumentaba

la resistencia a la tensión, se reducía la elongación a la rotura y disminuía la solubilidad en agua. En el análisis de la microestructura por SEM, observaron gran homogeneidad de los films compuestos por almidón de yuca y CMC para la concentración de CMC del 30%. También encontraron diferencias en las propiedades mecánicas en función de la humedad relativa de equilibrio, obteniendo los mejores resultados para el 34% de humedad relativa.

Melo et al. (2011) obtuvieron films de almidón de yuca con goma xanthan y glicerol como plastificante por extrusión y extensión, que equilibraron a diferentes humedades relativas (32, 65 y 90%). Observaron que la adición de la goma xanthan a los films mejoraba las propiedades mecánicas en los fabricados por extrusión. Los films fabricados por extrusión fueron opacos, mientras que por extensión fueron transparentes y más homogéneas. En los dos métodos de fabricación, la adición de la goma xanthan, mejoro la permeabilidad al vapor de agua, siendo mejor por extensión. También, observaron que no había diferencias significativas en las propiedades mecánicas en los ensayos realizados a diferentes humedades relativas.

Fama et al. (2006) obtuvieron films de almidón de yuca con glicerol como plastificante y sorbato de potasio como antimicrobiano. Observaron que la cristalinidad disminuyó con la adición del sorbato de potasio. Las propiedades mecánicas, se vieron también afectadas con la adición del sorbato de potasio, así como la humedad de los films que disminuyó significativamente. El análisis de la transición vítrea reveló 2

picos, uno atribuido al almidón con glicerol y el otro con sorbato de potasio, lo que refleja la separación de fases asociada a la diferente interacción del almidón con cada uno de los compuestos.

Estudios de films elaborados con almidón de maíz, yuca y ñame, realizados por Mali et al. (2006), con y sin plastificante, revelaron que el valor de la temperatura de transición vítrea es mayor en las muestras no plastificadas y disminuye con el almacenamiento. La cantidad de plastificante y el tiempo de almacenamiento, afectaron a la transición vítrea del almidón y a la cristalinidad. En los films sin plastificar y con 90 días de almacenamiento, observaron cambios en los valores de las propiedades mecánicas. Para la permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas no se observaron diferencias significativas entre los tres tipos de almidones plastificados después del almacenamiento.

Parra et al. (2004) observaron que cuando se añadió polietilen glicol (PEG) y glutaraldehido (GLU) a films de almidón de yuca presentaron mejores propiedades mecánicas y menor transmisión de vapor de agua. Los films con glutaraldehido presentaron muy bajos valores de la permeabilidad al vapor de agua.

Tabla I.1 Resumen de resultados obtenidos para films de almidón de yuca.

Componentes adicionales	Método de obtención	Acondicionado de los films	Resultado relevante	Referencia
Ácido esteárico (AE) Glicerol (G)	Extensión	58% H.R. 25°C. 2 días	La mezcla con G como plastificante y AE mejora las propiedades de permeabilidad al vapor de agua.	Reolon et al., 2013
Sucrosa (SU) Azúcar invertido (AI) Nano arcilla (N) Glicerol (G)	Extrusión	75% H.R. 25°C. 7 días	Adecuada plastificación del G y azúcares. Las nanoarcillas mejoraron las propiedades mecánicas y de barrera. Mejores expectativas en films extrusionados.	Souza et al., 2012
Carboxi metil celulosa (CMC) Glicerol (G)	Extensión	34% y 54% H.R. 25°C	Mejores propiedades mecánica a 34% de humedad relativa. Con el incremento de CMC se mejoran las propiedades mecánicas y la solubilidad, dando mejores resultados con la adición del 30%.	Tongdeesoontom et al., 2011
Goma Xanthan (GX) Glicerol (G)	1) Extensión 2) Extrusión	32% - 63% - 90% H.R.	Por el método de fabricación de extrusión los films son opacos y con mejores propiedades mecánicas. Por extensión son transparentes, homogéneos y buena barrera al vapor de agua. No hubo diferencias significativas a diferentes humedades relativas en las propiedades mecánicas.	Melo et al., 2011
Sorbato de potasio (SP) Glicerol (G)	Extensión	58% H.R. 25°C. 2, 4, 8 semanas	La adición del SP, dio films menor cristalinidad, menos humedad y mejores propiedades mecánicas.	Fama et al., 2007
Yuca Maíz Ñame Glicerol (G)	Extensión	64% H.R. 20°C. 48 horas y 90 días.	La transición vítrea es mayor en los films sin plastificar y además disminuye con el almacenamiento. En el almacenamiento se observan variación en las propiedades mecánicas en los films plastificados.	Mali et al., 2006
Glutaraldehido (GLU) Glicerol (G) Poli etilen glicol (PEG)	Extensión	148 horas. 284 horas.	Los films con PEG y GLU tienen buenas propiedades mecánicas y menor transmisión al vapor de agua.	Parra et al., 2004

I.3. ESTUDIOS PREVIOS CON UTILIZACIÓN DE GELATINA

I.3.1. Estructura y composición de la gelatina

Otro polímero muy utilizado en la industria alimentaria, es la gelatina que es un biomaterial muy versátil obtenido a partir de colágeno insoluble fibroso presente en huesos, piel, cartílagos y residuos de animales mamíferos y peces. Se produce en grandes cantidades y a bajo costo (Ahmad et al., 2012). Tiene capacidad de formar films solubles en agua caliente (Ramachadran y Chandrasekharan, 1968; Gennadios et al., 1997; Arvanitoyannis, 2002; Dranca y Vyazovkin, 2009; Hoque et al., 2010).

La gelatina posee una estructura helicoidal formada por 20 aminoácidos, que le confiere propiedades funcionales y de formación de films (Cuq et al., 1998). Esta estructura tiene tres cadenas de polipéptidos enrolladas entre sí, formando una hélice por formación de enlaces de hidrogeno (Ramachadran y Chandrasekharan, 1968; Brodsky y Ramshaw, 1997).

La gelatina es utilizada para la obtención de films biodegradables, por su capacidad para formar películas sobre los alimentos, ya que los protege de la luz y es buena barrera al oxígeno. En la actualidad tiene una novedosa aplicación, en el área de materiales para la ingeniería de tejidos, combinada con nano partículas inorgánicas (Bigi et al., 2004; Rao, 2007; Dranca y Vyazovkin, 2009).

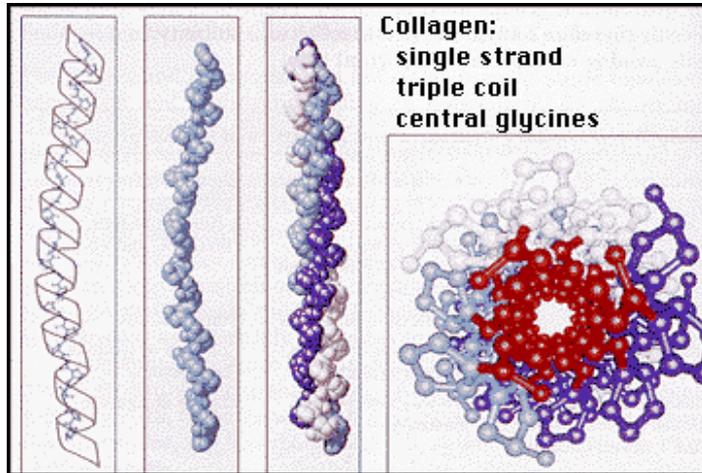


Figura I.1. Estructura helicoidal de la gelatina

Sus características físicas dependen de su origen. Las de origen marino son más deformables y débiles que las de origen animal, pero en general, independientemente de su origen, todas tienen muy buena resistencia a la tracción y barrera a los gases, aromas y migración de grasas. No obstante, poseen pobre barrera al vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica (Prodpran et al., 2007; Avena-Bustillo et al., 2011).

Una de las más utilizadas es la gelatina de pescado, siendo los peces más utilizados abadejo, bacalao, salmón, tilapia, potas, la perca del Nilo, atún, tiburón y bagre, que forman films de diferente calidad a los obtenidos con gelatina de origen porcino o bovino. (Krochta y De Mulder-Jhonson, 1997; Sobral et al., 2001; Crapo y Bechtel, 2003; Bigi et al., 2004; Avena-Bustillo et al., 2011).

En varios estudios realizados (Gontard et al., 1993; Avena-Bustillos et al., 2011) se ha observado que las propiedades mecánicas (módulo de Young) de los films obtenidos tienen

valores más altos con la gelatina de origen bovino y porcino, seguidos de los de gelatina de peces de agua caliente y de los de peces de agua fría. En cuanto a la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno, las gelatinas de pescado de agua fría presentan mejores propiedades barrera (Lim et al., 1999; Mehyar y Han, 2004; Chiou et al., 2009; Gómez- Estaca et al., 2009; Avena- Bustillos et al., 2011).

Los films de gelatina se pueden combinar con otros compuestos para la obtención de films y obtener matrices con diferentes funciones como antimicrobianas o antioxidante (Johnston-Banks, 1990; Gómez-Guillen et al., 2009).

I.3.2. Cambios estructurales de la gelatina

La gelatina forma geles que se estabilizan a las 18 horas, cuyas propiedades dependen de su grado Bloom. Los grados Bloom de la gelatina tiene relación directa con el nivel de re-naturalización alcanzado durante la gelificación, que afecta a las propiedades mecánicas y se relaciona también con los valores de entalpia de desnaturalización, que aumenta con el aumento del índice Bloom. (Bigi et al., 2004; Dai et al., 2006). Existe una relación directa entre el contenido de triples hélices y el índice de Bloom lo cual se relaciona con proceso de re-naturalización (Ross- Murphy, 1992; Bigi et al., 2001; Bigi et al., 2004).

El calentamiento de la gelatina provoca la desnaturalización y separación de las tres hélices, que la configuran al romperse los enlaces intracadena por puentes de hidrogeno (Dai et al., 2006).

Al enfriar se produce la gelificación (Veis, 1964; Ross-Murphy, 1998) siendo este un fenómeno termorreversible. La formación de films de gelatina implica una primera etapa de gelificación y el posterior secado del gel. Por tanto, durante la formación de films de gelatina se producen cambios del mismo tipo más la progresiva agregación de cadenas a medida que se pierde agua.

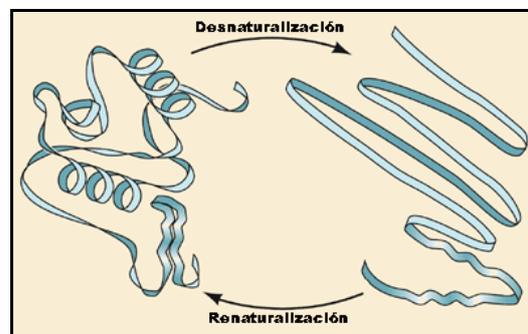


Figura I.2. Reorganización de la gelatina

I.3.3. Propiedades y aplicación de films de gelatina

Las propiedades físicas de films de gelatina dependen de la materia prima de donde proceden y de los procesos y condiciones de obtención. Dependen también de los parámetros del proceso de obtención del film: ingredientes de la formulación, de la adición o no de plastificantes y de la temperatura y tiempo de secado. Sorbitol y glicerol son los plastificantes más comúnmente utilizados para la obtención de films de gelatina. La obtención y caracterización de films de gelatina ha sido abordada por

diferentes autores y en la tabla 1.2 se resumen algunos de los resultados obtenidos.

Los films con glicerol son altamente sensibles a la humectación, no muy duros y más extensibles que los obtenidos con sorbitol. Otros plastificantes como di etilenglicol, etilenglicol o propilenglicol son compatibles con la gelatina, pero son menos eficaces para ajustar las propiedades funcionales del film Vanin et al. (2005).

Los Films de gelatina pueden obtenerse por extensión de las dispersiones formadoras de films y posterior secado y también por extrusión y moldeo por compresión. Park et al. (2008) encontraron que los films obtenidos por extrusión presentan menores tensiones de deformación y mayor extensibilidad y permeabilidad al vapor de agua.

Wen et al. (2012) observaron que al adicionar aceite de oliva a films de gelatina, el tamaño de gotas y la distribución del lípido, tuvo efecto directo sobre las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua. Observaron que el proceso de secado de los films afectó a la dispersión de las gotas de aceite en la matriz lo que influyó en las propiedades de barrera al vapor de agua.

Andreuccetti et al. (2012) obtuvieron films por extrusión, soplado y extensión, con la adición de extracto de yuca *Schidigera*, observaron que, por extrusión, se obtenían mejores propiedades de mecánicas. Por el método de soplado, se obtuvieron los mejores resultados para la permeabilidad al vapor de agua. En el espectro de infrarrojos no se detectó ninguna variación al

adicionar el extracto de yuca para los diferentes métodos de obtención.

La incorporación de quitosano a films de gelatina de origen bovino y de pescado dio lugar a una mayor resistencia mecánica, especialmente con la de pescado (Gómez-Estaca et al., 2011). Con los films de gelatina de bovino, se obtuvo una mejor barrera al vapor de agua. La adición de quitosano a films gelatina ambos orígenes mejoró las propiedades físicas. La de origen marino potenciaron el efecto antimicrobiano del quitosano frente al *Staphylococcus aureus*.

Kanokrat et al. (2010) incorporaron ácido oleico y ácido esteárico a una matriz de gelatina de tiburón azul. En los films se observó que con la adición de ácido oleico, se obtuvo mejor efecto plastificante, pero pérdida de transparencia y peores propiedades mecánicas. Los films con ácido esteárico fueron más transparentes y con mejores propiedades de barrera al vapor de agua.

Bertan et al. (2005) también incorporaron ácidos grasos esteárico y oleico junto a exudado de un árbol brasileño (elemí) a la matriz de gelatina, observando que los films mejoraron las propiedades de barrera al vapor de agua, pero perdieron resistencia mecánica y se hicieron más opacos. Esto se atribuyó a la falta de compatibilidad del lípido y los ácidos grasos con la matriz. Esto se relacionó con lo observación de dos transiciones vítreas, lo que refleja la separación de fases en la matriz.

Kwang et al. (2004) estudiaron el efecto de la adición de gelano a films de gelatina, observando que los films mejoraron en las

propiedades mecánicas con el aumento de la proporción de gelatina en la matriz. Las propiedades mecánicas de los films fueron dependientes de la relación gelano-gelatina y concentración de NaCl. La resistencia a la tracción disminuyó a medida que se aumentó la relación gelano-gelatina a la vez que aumentó la elongación hasta fractura.

En trabajos de investigación sobre mezclas de gelatina con quitosano se determinó que la combinación con gelatina, mejoraban las características de permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas. Algo que también se observó cuando se combina con gelano, donde se incrementó el valor del módulo de Young (Kwang et al., 2004).

Se compararon gelatinas de origen bovino y de origen marino en cuanto a su interacción con quitosano, observándose una mejor interacción para la gelatina de origen marino, dando geles con mayor resistencia (Gómez-Estaca et al., 2011). Las interacciones entre la gelatina y el quitosano se deben a uniones electrostáticas, a los puentes de hidrogeno y la formación de las estructuras de triple hélice del colágeno, que mejora las características finales de los films (Ledward, 1986; Taravel y Domard, 1995).

En el análisis microestructural por SEM de films de gelatina permitió observar estructuras homogéneas en films mixtos de gelatina-aceite, aunque también se han observado irregularidades y superficies rugosas debido a coalescencia y cremado de las gotas de aceite durante el secado del film (Atares et al., 2010; Ghasemlou et al., 2011).

Tabla I.2. Resumen de resultados obtenidos en estudios con films de gelatina.

Tipo de gelatina	Otros componentes	Método de obtención	Acondicionado de los films	Resultados relevantes	Referencia
Bovino 150 Bloom tipo B	Aceite de oliva (A) Glicerol (G)	Extensión	50% H.R. 25°C. 48 horas.	El tamaño de gota y distribución del A y condiciones de secado tiene influencia directa sobre las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua.	Wen et al., 2012
Cerdo 250 Bloom tipo A	Extracto de yucca Schidigera (YS) Glicerol (G)	Extrusión Soplado	60 % H.R.	Por el método de extrusión se obtienen mejores propiedades mecánicas. Por el método de soplado mejores propiedades de barrera al vapor de agua.	Andreuccetti et al., 2012
Bovino Bloom 200/220 tipo A Atún	Quitosano (Q) Glicerol (G) Sorbitol (S)	Extensión	58% H.R. 22°C. 3 días	Los films con gelatina de origen marino tienen mejores propiedades mecánicas. Los films con gelatina bovina son mejor barrera al vapor de agua. El Q y la gelatina de origen marino tienen mejores propiedades antimicrobianas.	Gómez-Estaca et al., 2011
Tiburón azul	Ac. Oleico (AO) Ac. Esteárico (AE) Glicerol (G) Sucrosa (Su)	Extensión	50 % H.R. 25°C. 24 horas	Los films con AO, presentan una pérdida de transparencia. Los films con AE, tiene mejor propiedad de barrera al vapor de agua, más transparentes, pero peores propiedades mecánicas.	Kanokrat et al., 2010
Bovino tipo A Bloom 244	Aceite Elemí (EL) Palmítico (PA) Esteárico (ES) Tricetina (Tr)	Extensión	50-60% H.R. 25°C. 48 horas	La adición de ácidos grasos y el lípido, dio lugar a films con buena barrera al vapor de agua, menor resistencia mecánica, mayor opacidad y la aparición de dos transiciones vítreas.	Bertan et al., 2005
Cerdo	Glicerol (G) Propilen glicol (PPG) Di metil glicol (Di DTG) Etilen glicol (ETG)	Extensión	58% H.R. 25°C.	Los diferentes plastificantes presentaron buena compatibilidad con la matriz de gelatina En cuanto a propiedades funcionales el glicerol dio los mejores films.	Vanin et al., 2005
Porcino 300 Bloom tipo A	Gelano (GL)	Extensión	50% H.R. 25°C. 2 días	La resistencia mecánica de los films disminuyó con el aumento de la proporción de GL.	Kwang et al., 2004

I.4. FILMS MIXTOS ALMIDÓN – GELATINA

La mezcla almidón-gelatina en matrices mixtas puede constituir una mejora de las propiedades mecánicas de los almidones. Con la adición de gelatina a films de polisacáridos, diferentes autores (Pérez-Gago y Khochta, 2001; Lee et al., 2004; Pranoto et al., 2007; Hassan and Norziah, 2012) han observado que hay un nivel de interacción óptimo entre los polisacáridos y la gelatina, donde la gelatina es la fase dominante en el sistema, concluyendo que el 2% corresponde a la interacción entre polisacárido y gelatina. Los polisacáridos forman redes mixtas con las moléculas de gelatina en base a que la gelatina es catiónica y muchos de los polisacáridos son aniónicos (Fonkwe Narsimhan y Cha, 2003).

En cuanto a las propiedades mecánicas, el incremento del índice de Bloom en la gelatina, está asociado a mayores valores del módulo de Young, extensibilidad y tensión a la fractura y en definitiva a films más rígidos. (Bigi et al., 2004). La gelatina combinada con almidones como el sagú, dio lugar a un incremento significativo en la resistencia a la tracción (TS), con una sola transición vítrea, lo que indica que hay compatibilidad entre la proteína y el almidón en la matriz de los films (Hassan y Norziah, 2012).

La baja barrera al vapor de agua es el principal problema de los films de almidón y gelatina. En el caso de los almidones, este problema se agrava por el avance de la retrogradación durante su almacenamiento. En este sentido, la incorporación de lípidos a la matriz mixta de almidón gelatina es una estrategia que puede

redundar en una mejora de la permeabilidad al vapor de agua. En el caso de films de almidón, se han utilizado diferentes aditivos, entre ellos lípidos, para intentar paliar el problema de la retrogradación. Así, la incorporación de estos a las matrices, mejora la barrera al vapor de agua, ya que aumenta la hidrofobicidad de la matriz, aunque los films se hacen muy frágiles por la formación de complejos amilosa lípido con formas de cristalización tipo V (García et al., 2000a; Jiménez et al., 2012). La incorporación de lípidos supone también un aumento en la opacidad de los films en la mayoría de los casos (Bertan et al., 2005).

En diferentes estudios, se han relacionado las mejoras de la barrera al vapor de agua con la incorporación de mezclas de lípidos a matrices de polímeros, (Koelsch y Labuza, 1992; Yang y Paulson, 2000). También está demostrado que en diferentes polisacáridos y proteínas, la adición de ácidos grasos saturados, en comparación con los ácidos grasos insaturados, es más efectiva en la reducción de la permeabilidad al vapor de agua. Esto se ha observado en matrices de almidón (Jiménez et al., 2012), de caseinatos (Fabra et al., 2010a) y de hidroxipropilmetilcelulosa (Jiménez et al., 2010).

La incorporación de aceite de oliva extra virgen a matrices de gelatina y almidón, condujo a un aumento en el módulo de elasticidad y a la interconectividad microestructural de la fase oleosa dispersa (Parra et al., 2004; Wen et al., 2012). Como se demostró en estudios realizados en gelatina de bovino y aceite de oliva, la barrera al agua y la resistencia a la tracción mejoraron

con la adición del lípido, obteniendo una buena barrera a la luz ultravioleta y potenciando el carácter hidrófobo de la gelatina (Wen Ma et al., 2012).

Se han estudiado las propiedades físicas y mecánicas de films mixtos de almidón de sagú y gelatina de pescado utilizando glicerol y sorbitol como plastificantes (Hassan y Norziah, 2012). Los films con proporciones almidón-gelatina 3:1, 4:1 y 5:1 y glicerol presentaron buena flexibilidad, pero no con mayor proporción de gelatina (proporción 2:1). Las diferentes proporciones almidón gelatina afectaron a las propiedades mecánicas y de barrera. La microestructura de los films con glicerol fue más homogénea que con sorbitol, aunque en ambos casos se aprecian falta de miscibilidad total entre los polímeros. A menor proporción de proteína la estructura del film es más homogénea con ambos plastificantes. Por otro lado, el análisis por DSC reveló una única transición vítrea en todos los casos, del orden de 60°C para los films con glicerol y 50°C para los films con sorbitol. La incorporación de gelatina a los films provocó una reducción del orden de 30°C en los valores de la Tg del almidón sin plastificantes, independientemente de la proporción. Estos resultados sugieren la compatibilidad parcial de los polímeros, donde pareciera que la proteína se mezcla bien con el almidón hasta una determinada proporción, aunque a mayor proporción se separa en otra fase rica en gelatina.

Veiga-Santos et al. (2007) han estudiado el efecto plastificante de sacarosa y azúcar invertido en films mixtos de almidón de yuca. Ambos resultaron efectivos en el incremento de la extensibilidad

de los films, pero incrementaron su capacidad de adsorción de agua. La mezcla con gelatina no afectó a las propiedades mecánicas de los films de almidón con sacarosa y azúcar invertido.

De los estudios realizados, no se tienen indicios claros acerca de las ventajas o no de la mezclas almidón-gelatina para la obtención de films. No obstante, estos son escasos y abordan aspectos puntuales que no permiten obtener una clara panorámica acerca de las posibilidades de las mezclas de estos polímeros, de alta disponibilidad y bajo coste, lo que aconseja profundizar en el estudio de las mismas.

I.5. FILMS DE BIOPOLIMEROS COMO VEHÍCULO DE ANTIMICROBIANOS.

La incorporación de compuestos con actividad antimicrobiana en la formulación de films poliméricos es una de las estrategias para la obtención de materiales de envase activo. Estos compuestos pueden liberarse a la superficie contaminada de forma controlada, permitiendo así la extensión de la vida útil del producto recubierto. La adición de agentes antimicrobianos, como los sorbatos y benzoatos, los mismos que se agregan como aditivos para inhibir el crecimiento de microorganismos ha sido estudiada (Fama et al., 2003).

Los aceites esenciales de plantas tienen la particularidad de presentar propiedades antimicrobianas y antioxidantes y se han realizado numerosos estudios para su incorporación en la

formulación de films para envasado de alimentos. Son además productos GRAS (según la FDA) lo que les convierte en productos seguros para su uso alimentario. En cuanto al poder antimicrobiano de los aceites esenciales provocan una mayor de inhibición del crecimiento en las bacterias Gram positivas (*S. Aureus* y *B. Cereus*) que en las Gram-negativas (*S. Enteritidis* y *E. Coli*). Esto atribuye a la presencia de una pared celular que evita la difusión de compuestos hidrófobos en las bacterias Gram-Negativas (Pelissari et al., 2009).

Estudios realizados en almidón de yuca con aceite esencial de canela, demostraron acción antimicrobiana, frente a *P. Comuna* y *Eurotium Amstelodami*, que son mohos causantes del deterioro del pan (Souza et al., 2013). Para el control de los conidios de los mohos *Colletotrichum Gloeosporiodes* y el *Colletotrichum Musae* de las frutas banano y guayaba, se ensayaron varios aceites esenciales: el *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon martinii*, *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum sp.* y el *Cymbopogon citratos*, determinando que estos aceites esenciales causan daño en la estructura celular de los conidios de los mohos evitando que estos germinen (Rozwalka et al., 2010).

Trabajos de Barrera y García. (2008) con diferentes aceites esenciales aplicados sobre *Fusarium sp.*, aislado en papaya, mostraron la inhibición del crecimiento del micelio, siendo mayor el efecto con aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo). Con los aceites de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo) y *Telexys ambrosioides* (epazote) se observó un efecto inhibitor muy dependiente de la concentración.

En la actualidad la tendencia es desarrollar mecanismos de control para evitar el deterioro de los alimentos, asegurando una mayor la calidad y vida útil de los mismos. Las pérdidas de alimentos en el campo y postcosecha son elevadas y uno de los mecanismos para minimizarlas es la aplicación de recubrimientos comestibles funcionales que detengan el crecimiento de microorganismos como mohos, bacterias y virus (Campos et al., 2011). Los recubrimientos comestibles no pueden sustituir hoy en día a los materiales de embalaje, pero contribuyen al desarrollo de envases activos sin impacto al medio ambiente (Chang et al., 2000; Rojas-Grau et al., 2007).

Las frutas y vegetales son atacadas según la variedad, zona de cultivo y estado de madurez por diferentes microorganismos, por lo que los métodos para control de la podredumbre va desde cambios en el cultivo, hasta procesos industrializados como el uso de atmosferas controladas. Otra de las tendencias del mercado es la aplicación de recubrimientos activos biodegradables como son los obtenidos a partir de los biopolímeros y los aceites esenciales (Fama et al., 2003; Durango et al., 2009).

En las tablas 1.3 y 1.4 se resumen algunos ejemplos de la aplicación de biopolímeros con aceites esenciales para el control del crecimiento de microorganismos específicos en ensayos *in vitro* y en diferentes frutas.

Tabla I.3. Films con incorporación de aceites esenciales para estudios microbiológicos *in vitro*.

Polisacárido	Aceite Esencial	Microorganismo	Referencia
Quitosano	Ácido Oleico Canela hoja	<i>Aspergillus Niger</i> <i>Botrytis cinérea</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Perdones et al., 2014
Gelatina	Canela	<i>Penicillium comuna</i> <i>Eurotium amstelodami</i>	Souza et al., 2013
Gelatina de pez	Bergamota Limón	<i>Escherichia Coli</i> <i>Listeria Monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella typhimarium</i>	Mehraj et al., 2012
Hidroxipropilmetilcelulosa Quitosano	Bergamota Limón Té verde	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Sánchez-González et al., 2011
Almidón de amaranto, Quitosano, Almidón de maíz	Orégano	<i>Aspergillus Níger</i> <i>Penicillium spp</i>	Ávila-Sosa et al., 2010
Puré de manzana	1) Canela, pimienta de Jamaica, clavo de olor. 2) Canela, germén de trébol, pimienta de Jamaica	1) <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella entérica</i> <i>Listeria monocytogenes</i> 2) <i>L. monocytogenes</i> <i>S. entérica</i>	Rojas-Grau et al., 2007
Quitosano	Árbol de té	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Penicillium italicum</i>	Sánchez-González et al., 2010

(Continua)

Tabla I.3. Films con incorporación de aceites esenciales para estudios microbiológicos *in vitro*.

Polisacárido	Aceite Esencial	Microorganismo	Referencia
Gelatina-quitosano 6:2	Clavo, hinojo, cipreses, lavanda, tomillo, pino, hierba de la cruz, romero	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Photobacterium phophoreum</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gómez-Estaca et al., 2010
Quitosano	Canela	<i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus platarum</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Seyed Mahdi et al., 2010
Almidón de yuca Quitosano (0,82:0,05)	Orégano	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Pelissari et al 2009
Quitosano- Carboxi metil-celulosa- Caseína (0,2:0,75:5)	Oliva, romero, cebolla Pimienta, arándano, ajo, Orégano y orégano con carvacrol 5%	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ponce et al., 2008
Puré de manzana	1) Orégano, carvacrol 2) Canela, limón, citral, cinnamaldehido	<i>Escherichia coli</i>	Rojas –Grau et al., 2007

Tabla I.4. Aplicaciones de films con aceites esenciales para el control microbiano en la conservación de diferentes frutos.

Polisacárido	Aceite Esencial	Microorganismo	Frutos	Referencia
Quitosano	Bergamota Tomillo Aceite de árbol de té verde	<i>Penicillium italicum</i>	Naranjas	Cháfer et al., 2012
Quitosano	Limón	<i>Botrytis cinérea</i>	Fresas	Perdones et al., 2012
Goma arábica	Limón Canela	<i>Colletotrichum</i> <i>Gloeosporiodes</i> <i>Colletotrichum Musae</i>	Papaya y banano	Maqbool et al., 2011
Hidroxipropilmetil-celulosa	Extracto de propolis	<i>Bacterias mesófitas aéreas</i> <i>Levaduras y mohos</i>	Uvas de mesa	Pastor et al., 2011
Hidroxipropil metil-celulosa Quitosano	Bergamota	<i>Bacterias mesófitas aéreas</i> <i>Levaduras y mohos</i>	Uvas de mesa	Sánchez-González et al., 2011
Aloe vera	Tomillo	<i>Penicillium digitatum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizopus stonifer</i>	Nectarina	Navarro et al., 2011
Goma de Mezquite	Tomillo Limón mexicano	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i> <i>Rhizopus stonifer</i>	Papaya	Bosquez-Molina et al., 2010

I.5.1. Influencia de la incorporación de aceites esenciales en las propiedades de los films biodegradables

Las matrices de biopolímeros son utilizadas como vehículo para la adición de aceites esenciales, con la finalidad de obtener un efecto antimicrobiano. No obstante, su incorporación conlleva cambios en la estructura de los films, con alteración en sus propiedades físicas, dependiendo de la naturaleza del aceite esencial, la cantidad adicionada o las condiciones de secado. El proceso de secado de los films tiene influencia directa en la organización de los componentes de la matriz y, en el caso de films con lípidos, ocurren fenómenos de floculación y coalescencia, que afectan en gran medida en las características finales de los films (Campos et al., 2011). En el caso de lípidos volátiles como los aceites esenciales, una parte del aceite se vaporiza durante el secado del film, lo que implica una menor efectividad (Sánchez-González et al., 2011).

La incorporación de ácido láurico, ácido tánico o aceite esencial de orégano en films de quitosano y almidón de yuca supuso una reducción de la transmisión de oxígeno, de la resistencia a la tracción y de la elongación de rotura, una mayor flexibilidad y una disminución a la permeabilidad al vapor de agua. (Zhai et al., 2004; Pelissari et al., 2009; Pyla et al., 2010; Zhai et al., 2010; Zhong y Li, 2011).

Los films de quitosano, almidón de yuca y puré de manzana, con aceites esenciales de canela, clavo, orégano y limón, presentaron

una permeabilidad al vapor de agua con tendencia a disminuir, mejorando esta propiedad dependiendo de la matriz y del tamaño de los glóbulos del aceite; a menor tamaño, menor permeabilidad al vapor de agua. (Debeaufort et al., 2000; Rojas Grau et al., 2007; Pelissari et al., 2009; Sánchez–González et al., 2010; Mahdi et al., 2010).

En otros se estudios se observó un aumento de la permeabilidad al vapor de agua con la adición de aceites, lo cual se explicó en base a interacciones específicas de los componentes del aceite con la matriz polimérica y el plastificante (Alves et al., 2007; Kechichian et al., 2010; Bonilla et al., 2011; Souza et al., 2013; Perdonés et al., 2014).

La permeabilidad al oxígeno es otra de las propiedades de los films que ha mostrado tendencia a disminuir con la adición de aceites esenciales al igual que la permeabilidad al vapor de agua (Rojas-Grau et al., 2007). No obstante otros estudios muestran un incremento en la permeabilidad al oxígeno, asociada a la incorporación de aceites esenciales (Bonilla et al., 2011; Souza et al., 2013; Perdonés et al., 2014). La mayor solubilidad del oxígeno en la fracción lipídica puede explicar este comportamiento.

Numerosas estudios sobre el comportamiento de las propiedades mecánicas de matrices de biopolímeros con aceites esenciales indican que la incorporación de la fase lipídica provoca una disminución del módulo de elasticidad, así como del esfuerzo a la tracción, pero aumenta la deformabilidad. Es decir, los films

obtenidos, se vuelven menos rígidos, menos duros y más deformables, lo que lo relacionan con una reducción de las fuerzas de interacción entre las cadenas del polímero por la interacción con los componentes del aceite (Rojas Grau et al., 2007; Kechichian et al., 2010; Atares et al., 2010; Sánchez-González et al., 2010; Bonilla et al., 2011; Souza et al., 2013).

Los films con aceites esenciales presenta también cambios en la transparencia debido a la presencia de una fase dispersa y al debilitamiento de la asociación de cadenas que provoca cambios de compacidad (Bonilla et al., 2011; Bonilla et al., 2013). Otra de las propiedades de interés, es el brillo y al incorporar los aceites esenciales a la matriz polimérica, se observa, en general, un descenso tanto mayor como mayor es el contenido de aceites esenciales en la matriz (Gómez-Estaca et al., 2009; Mahdi et al., 2010; Bonilla et al., 2011; Bonilla et al., 2013). El descenso del brillo se relaciona con el aumento de la rugosidad en la superficie de los films (Atare et al., 2010; Bonilla et al., 2013). Los parámetros de rugosidad superficial, obtenidos por microscopia de fuerza atómica (AFM) están directamente relacionados con los valores de brillo (Debeaufort et al., 2000).

Los estudios estructurales por microscopia electrónica de barrido (SEM) indican que, al adicionar los aceites esenciales, la estructura de los films se hace más abierta y heterogénea debido a que las gotas de aceite se intercalan en la matriz del polímero. Al aumentar

la cantidad de aceite esencial aumenta el número de partículas lipídicas embebidas en la matriz y esto influye en gran medida en la permeabilidad, brillo y propiedades mecánicas. (Mahdi et al., 2010; Atáres et al., 2010; Bonilla et al., 2013 ; Souza et al., 2013; Perdonés et al., 2014).

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

En base a los estudios previos, los films mixtos de almidón-gelatina, con incorporación de lípidos para modular su capacidad de retención de agua y sus propiedades de barrera al vapor de agua, es una alternativa que ofrece expectativas interesantes. La gelatina, a través de sus interacciones con las cadenas de amilosa y amilopectina podría inhibir los fenómenos de cristalización del almidón, limitando su fragilidad y envejecimiento con el tiempo. A su vez la incorporación de lípidos podría suponer una mejora en las propiedades barrera y su incorporación a la matriz podría estar compatibilizada por el carácter anfifílico de la proteína. Por otro lado, el almidón de yuca tiene baja proporción de amilosa, la cual cristaliza rápidamente durante la etapa de secado de los films, mientras que la amilopectina cristaliza de forma más retardada y podría incluso no hacerlo si coexisten en la matriz otros componentes que inhiban este fenómeno. La incorporación a los films mixtos de almidón-gelatina de agentes antimicrobianos y antioxidantes como los aceites esenciales permitiría obtener films bioactivos, para mejorar la conservación de alimentos pereceros, como fruta y hortalizas, alargando su vida útil.

OBJETIVO GENERAL

En base a estas hipótesis, el objetivo general de la presente tesis es caracterizar las propiedades funcionales de films mixtos de almidón de yuca-gelatina en diferentes proporciones, analizando el efecto de la incorporación de lípidos en la matriz. Así mismo, la incorporación de agentes bioactivos, como aceites esenciales, en la formulación almidón-gelatina seleccionada forma parte del objetivo general, a fin de obtener films bioactivos para su aplicación en la conservación de frutas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterización de las propiedades físicas de films mixtos almidón de yuca-gelatina con y sin lípidos.

- 2) Caracterización de las propiedades estructurales de films mixtos almidón de yuca-gelatina con y sin lípidos.

- 3) Incorporación de aceites esenciales con probado efecto antimicrobiano (de corteza de canela, clavo y orégano) a la formulación seleccionada de films mixtos almidón-gelatina y análisis del efecto producido en las propiedades físicas de los films y en su actividad antimicrobiana.

4) Estudio de aplicación de los films bioactivos obtenidos, con aceites esenciales, en la conservación postcosecha de frutos de papaya.

PLAN DE TRABAJO

Para conseguir los objetivos fijados se propuso el siguiente plan de trabajo:

1. Ensayos iniciales para determinar las condiciones de elaboración de los films: proporción de plastificante y condiciones de gelatinización, homogenización y secado.
2. Diseño experimental de las formulaciones de films mixtos almidón de yuca-gelatina con y sin lípido y obtención de los films.
3. Caracterización de las propiedades de los films acondicionados a 25°C. y 53% de humedad relativa, a 1 semana y 5 de semanas de almacenamiento.
 - a. Permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno.
 - b. Propiedades mecánicas.
 - c. Propiedades ópticas: transparencia y brillo
 - d. Microestructura por SEM y AFM.
 - e. Espectro de difracción de rayos X.

f. Análisis calorimétrico.

4. Selección de la formulación con mejores propiedades funcionales y estudio del efecto de la incorporación de aceites esenciales para la obtención de films bioactivos. Para ello, se caracterizarán en los films con aceites esenciales, en comparación con el control:

- a. Permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno.
- b. Propiedades mecánicas.
- c. Propiedades ópticas: transparencia y brillo
- d. Microestructura por SEM
- e. Pérdida de aceite esencial durante el secado del film
- f. Propiedades antifúngicas contra dos hongos causantes de deterioro en frutas tropicales: ensayos *in vitro*

5. Aplicación de los films con aceites esenciales, en forma de recubrimientos a frutos de papaya y estudio de su influencia en parámetros de calidad y estabilidad. Se analizará el efecto del recubrimiento en las siguientes propiedades de los frutos, inmediatamente después del recubrimiento y a la semana de almacenamiento en condiciones ambientales:

- a. Sólidos solubles, acidez y pH.
- b. Color y textura.

c. Control de la respuesta del fruto a la infección con los hongos causantes de deterioro.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIAS PRIMAS

Las materias primas utilizadas fueron el almidón de yuca procedente de Asia almidón modificado CO, LDT (Kalasin, Tailandia) y proporcionada por Quimidroga SA (Barcelona, España); gelatina de piel bovina tipo A (Bloom 220-240°) procedente de Gelatinas Alimenticias Sancho de Borja, S.L. (Zaragoza, España), mono y di glicérido de ácidos grasos (E471) adquirido a Cargill (Barcelona-España) y glicerol proporcionado por Panreac Química, SA (Barcelona-España).

III.1.1. Características de las materias primas

El almidón de yuca contiene un 9,28% (g/100g) de amilosa y un ratio de amilosa/amilopectina de 1:9,78. Las determinaciones del contenido en amilosa y amilopectina se realizaron en un kit enzimático (Megazyme, Wicklow, Irlanda).

Los aceites esenciales (AE), fueron adquiridos a Herbes del Moli (Benimarfull, Alicante, España) y todo ellos con la certificación ecológica. Los aceites esenciales utilizados fueron de orégano, clavo y canela procedente de la corteza. Las densidades de estos aceites a 20°C, y según indica su ficha comercial, son de 0,920 - 0,960 g/cm³ en el orégano, 1,042 – 1,062 g/cm³ en el clavo y 0,947 g/cm³ en la corteza de canela.

Tabla III.1. Características de los aceites esenciales (AE) de canela, clavo y orégano: Principales Componentes (expresados en %) y punto de ebullición (entre paréntesis) de los mismos (Santamaría y Rosello, 2012 datos no publicados).

Componentes (punto de ebullición)	Corteza de Canela (%)	Clavo (%)	Orégano (%)
Eugenol (256°C)	60	90	-
Acetato de cinamilo (265°C)	5	-	-
Acetato de eugenilo (268°C)	18	-	-
Benzoato de benzilo (323°C)	4	-	-
Beta-Cariofileno (280°C)	-	7	-
Timol (233°C)	-	-	21
Carvacrol (238°C)	-	-	50
Gamma-Terpineno (183°C)	-	-	9
Para-Cimeno (177°C)	-	-	11

III.2. PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LOS FILMS

III.2.1. Films con almidón, gelatina y lípido

Se prepararon ocho formulaciones diferentes utilizando almidón de yuca (S), gelatina (G), glicerol y un lípido, el E471(e), un mono y di glicérido de ácidos grasos. Las formulaciones se prepararon con el fin de obtener una suspensión al 2% (w / w) de polisacáridos. Las proporciones (%) de almidón (S): gelatina (G) utilizadas fueron 0:100, 50:50, 75:25 y 100:0, respectivamente. Todas las formulaciones

contenían glicerol como plastificante (relación de 1:0,25 polímero: glicerol) y en cuatro de las formulaciones, se añadió un 15% (lípidos) de mono y di glicéridos de ácidos grasos E471(e) respecto al polímero. Las dispersiones de ambos polímeros se prepararon por separado y posteriormente se mezclaron y se incorporó el glicerol, como se explica a continuación.

Se mantuvieron las dispersiones de almidón, bajo agitación, a 95°C durante 30 minutos para inducir la gelatinización del almidón. Las dispersiones de gelatina se obtuvieron bajo agitación a 80° C durante 30 min. Las mezclas de almidón - gelatina se prepararon después de tener listas las dispersiones correspondientes de cada polisacárido puro. Posteriormente, se añadió el plastificante y las dispersiones se homogeneizaron. En el caso de emulsiones que contenían el mono y di glicéridos de ácidos grasos (lípidos), éstos se incorporaron antes de la etapa de homogeneización.

Una vez homogeneizadas las dispersiones formadoras de film, se vertieron uniformemente sobre una placa de teflón (de 150 mm de diámetro interno y 8 mm de profundidad), ajustando el peso vertido por placa que permita alcanzar 1,5 g de sólidos totales.



Figura III.1. Molde de teflón

Se dejaron secar las placas por convección natural durante aproximadamente 48 h a 53% de humedad relativa y 25°C., condiciones necesarias para obtener films homogéneos, sin defectos aparentes. Los films, una vez secos, se separaron de la superficie de la placa cuidadosamente para que quedaran intactos, y se acondicionaron en cámaras a 25° C y 53% HR durante 1 y 5 semanas (tiempo inicial y tiempo final respectivamente). Para su equilibrado se utilizaron desecadores con la sal correspondiente, solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ de Panreac Química, S. (Castella del Vallés, Barcelona).



Figura III.2. Film de almidón de yuca

III.2.2. Films con almidón, gelatina y aceites esenciales

Se prepararon cuatro formulaciones diferentes utilizando una mezcla de almidón de yuca (S) y gelatina (G), glicerol y tres aceites esenciales, clavo (CL), orégano (O) y canela (C). La formulación de almidón de yuca (**S**), gelatina (**G**) y glicerol contenía un 1% de cada uno de los polímeros (proporción S:G 1:1) y una proporción polímeros:glicerol 1:0,25, y fue la utilizada como control. Las dispersiones de ambos polímeros se prepararon por separado y posteriormente se mezclaron y se incorporó el glicerol.

En las 3 formulaciones con aceites esenciales, éstos se incorporaron en proporción 1:0,25 (ratio polímero: aceite). Las cantidades correspondientes se añadieron a la dispersión polimérica antes de la homogenización. La homogenización se realizó durante 4 minutos a 12.800 r.p.m. utilizando un Ultra-Turrax Blue IKA-T25 Digital.

Después, las dispersiones se vertieron en las placas de teflón, ajustando el peso vertido por placa que permita alcanzar 1,5 g de sólidos totales. El aceite esencial de orégano está compuesto por componentes más volátiles (ver tabla III.1), mayoritariamente carvacrol, thymol, pineno y terpinol. Los compuestos mayoritarios (ver tabla III.1) de estos AE son para la canela, aldehído cinámico, cineol y eugenol y en el clavo, eugenol.

Los films se obtuvieron por extensión de la dispersión formadoras del film, sobre una placa de teflón (150 mm de diámetro interno), ajustando el peso vertido por placa para alcanzar 1,5 g de sólidos totales, y posterior secado por convección natural durante aproximadamente 48 h en condiciones ambientales. Los films, una vez secos, se separaron de la superficie de la placa y se acondicionaron a 53 % HR y 25°C.

Todos los films de las formulaciones con y sin lípido, así como los que contenían aceites esenciales, fueron acondicionados en una cámara a 25° C y 53% HR durante 1 y 5 semanas (tiempo inicial y tiempo final respectivamente, solo a los films con lípido se trabajo el tiempo de almacenamiento). Para su equilibrado se utilizaron desecadores con la sal correspondiente, solución saturada de Mg (NO₃)₂ de Panreac Química, S. (Castella del Vallés, Barcelona).



Figura III.3. Desecadores en cámara a temperatura y humedad controlada

III.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS

III.3.1. Medida del espesor

El espesor de los films se midió en diferentes áreas del mismo (entre 6 y 8), antes de realizar los diferentes ensayos físicos. Para ello se utilizó un micrómetro electrónico digital (Palmer, Connecta, España, $\pm 0,001\text{mm}$).

III.3.2. Control de humedad

Para la determinación de la humedad de los films (6 repeticiones), las muestras se secaron en una estufa de convección a 60°C durante 24 h y posteriormente se trasladaron a una estufa de vacío a 60°C durante 48 h. Luego se almacenaron en pentóxido de fósforo (P_2O_5)

(Panreac química, S.A, Castella del Vallés, Barcelona), para análisis posteriores.

III.3.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Las propiedades de barrera al vapor de agua de los films se evaluaron mediante la permeabilidad al vapor de agua, según una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh y col., 1993) para un gradiente de humedad relativa 53-100 % y temperatura de 25°C. Los films (4 repeticiones) se seleccionaron de tal forma que no tuvieran defectos físicos como son burbujas o agujeros. Las muestras se montaron entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 3,5 cm de diámetro (Payne, Elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica). En el interior de la copa se añadieron 5 ml de agua destilada (100% de humedad relativa). Las copas se introdujeron en un desecador equilibrado en las condiciones antes descritas, junto con un ventilador (CPU y S.Tech 12V) colocado en la parte superior, con el fin de homogeneizar la atmósfera y asegurar una resistencia despreciable en la superficie del film. Los desecadores se mantuvieron en una cámara a una temperatura controlada de 25°C. El estudio de la permeabilidad se realizó mediante controles de peso de cada copa con una balanza electrónica ($\pm 0,00001$ g) (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 horas durante aproximadamente 24 horas. La transmisión de

vapor de agua se determinó a partir de la pendiente obtenida en el análisis de regresión de los datos del peso frente al tiempo, dividido por el área del film. Se expresa la PVA en $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{KPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.



Figura III.4. Copas en desecador y en estufa a temperatura y humedad controlada.

III.3.4. Permeabilidad al oxígeno (PO)

La permeabilidad al oxígeno se determinó por medio de un equipo de medida de la transmisión de oxígeno (OX-TRAN 1/50 Mocon, Minneapolis, USA) en las condiciones antes descritas. Se colocó en una celda del equipo una muestra de los films (50 cm^2) para llevar a cabo el ensayo. Para ello, los films se expusieron a una corriente de nitrógeno por una cara, y por la otra a una corriente de oxígeno puro. Un sensor registró el oxígeno permeado, es decir el que ha

atravesado la capa del film. El ratio de transmisión de oxígeno se calculó teniendo en cuenta la cantidad de oxígeno y el área de la muestra. La permeabilidad al oxígeno se calculó dividiendo la tasa de transmisión de oxígeno entre la diferencia de presión parcial de oxígeno en las dos caras del film, y multiplicando por el espesor medio del film. Cada muestra se evaluó por duplicado. Se expresa la PO en $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$.

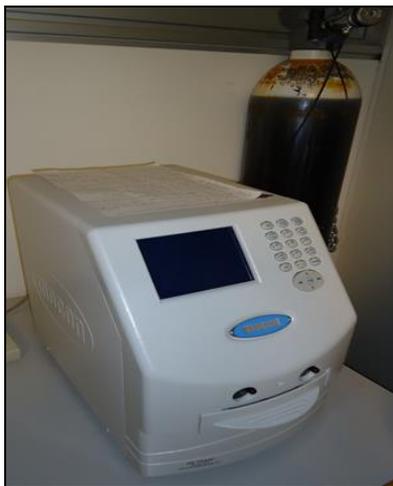


Figura III.5. Equipo para medir permeabilidad al Oxígeno OX-TRAN-MOCON

III.3.5. Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, England) de acuerdo al método estándar

D882 (ASTM, 2002). Para cada formulación, se cortaron 8 muestras rectangulares (de dimensiones 25 mm por 100 mm) y posteriormente se equilibraron en las condiciones antes descritas. Los films se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, England). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación del film fueron de 50 mm y 50 mm·min⁻¹, respectivamente.

Las curvas fuerza-distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ)-deformación de Henky (ϵ_H), lo que permitió obtener los parámetros mecánicos módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TS) y deformación hasta el punto de fractura (E). Donde ME, es la pendiente de la zona lineal de la curva σ vs. ϵ_H (MPa), TS representa la fuerza necesaria para romper la muestra (MPa) y por último, E es la distancia máxima a la cual se puede estirar el film antes de la rotura, referida a la ϵ_H (expresada en porcentaje).



Figura III.6. Equipo para medir propiedades mecánicas (Prensa Universal)

III.3.6. Propiedades ópticas: brillo y transparencia

Las propiedades ópticas, nos sirven para evaluar el impacto directo sobre el color y aspecto, destacando el parámetro del brillo y la transparencia. La opacidad de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Hutchings, 1999). Esta teoría se basa en que la luz que incide en un producto traslúcido puede ser absorbida o dispersada en función del coeficiente de absorción (K) y de dispersión (S) del material. Los espectros de reflexión son medidos sobre un fondo blanco de espectro conocido entre 400 y 700 nm., mientras más próximo al de referencia del blanco se considera que el film es más

transparente ya que oculta el fondo blanco, sobre el que se han toman las medidas. Se evaluaron 4 muestras de cada film.



Figura III.7. Equipo para medir transparencia (Espectro colorímetro Minolta)

Transparencia

La transmitancia interna de los films puede determinarse a partir de la ecuación 1. En esta ecuación R_0 es la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo negro ideal. Los parámetros a y b se calculan según las ecuaciones 2 y 3 siendo R la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo blanco de reflectancia conocida R_g . Los espectros de reflexión sobre fondo blanco y fondo negro se determinaron con un espectro colorímetro MINOLTA, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokio, Japón). Las determinaciones se realizaron

sobre la cara del film que había estado en contacto con el aire durante el secado, y los análisis se realizaron por triplicado.

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad \text{Ecuación (1)}$$

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

$$b = (a^2 - 1) \quad \text{Ecuación (3)}$$

Brillo

Para la medida del brillo se utilizó un Brillómetro Multi-Gloss 268, MINOLTA y se realizaron las medidas a un ángulo de incidencia de 20°, 60° y 85° respecto a la normal sobre un fondo negro estándar. Todas las medidas se hicieron por triplicado para cada ángulo de incidencia y se expresaron en porcentaje.

De acuerdo a la Norma ASTM D523 (1995), el brillo es la intensidad de luz reflejada especularmente por la superficie de la muestra, comparada a la intensidad de luz especularmente reflejada por la superficie de un estándar conocido, a un cierto ángulo de incidencia. Generalmente los valores se relacionan con un vidrio negro estándar con un índice de refracción de 1,567 que tiene un valor de 100.



Figura III.8. Equipo para medir brillo (Multi-Gloss MINOLTA)

III.3.7. Microestructura

El análisis de la microestructura de los films se hizo a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y de fuerza atómica (AFM). Los films se almacenaron en P_2O_5 con el fin de eliminar el agua ligada.

Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL® (modelo JSM-5410, Japón). Se cortaron muestras de film rectangulares de 6x1 mm, se sumergieron en nitrógeno líquido y se criofracturaron para obtener un corte limpio. Las muestras se montaron en un soporte de cobre para observar el perfil a través de su espesor y la superficie. Éstas se cubrieron de oro con el fin de hacerlas conductoras (durante 1,5 minutos), y se observaron directamente con un voltaje de aceleración de 10 KV. Se tomaron imágenes por

triplicado en la superficie y en el corte transversal de las diferentes muestras de film a los dos tiempos de almacenamiento.



Figura III.9. Equipo para observar microestructuras JEOL®

Microscopia de fuerza atómica (AFM)

Se utilizó un microscopio de fuerza atómica (Multimode, Bruker AXS, Inc. Santa Bárbara, California, USA). Las muestras se cortaron en secciones 1x1 cm para adherirlas a una superficie de metacrilato. Se realizaron tres repeticiones de cada film en cada tiempo de almacenamiento.

La topografía superficial de los films se observó en un Nanoscope IIIa, Scanning Probe Microscope de Digital Instruments, Veeco Metrology Group), versión 4.43r8. Se sometió cada muestra a un barrido superficial, sobre un área de 50x50 μm en modo "Tapping". También se realizó el barrido con una sonda NanoScope® V controller electronics para el análisis del barrido módulo de elasticidad superficial.

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 ecuación 4.

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad \text{Ecuación (4)}$$

Rugosidad media cuadrática (R_q): raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio (Z_j) al cuadrado ecuación 5.

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Se obtuvieron también las imágenes mediante el modo Phase Imaging, derivado del Tapping Mode, que permite detectar variaciones superficiales en composición, adhesión, fricción, viscoelasticidad y otras propiedades a partir de los datos topográficos.

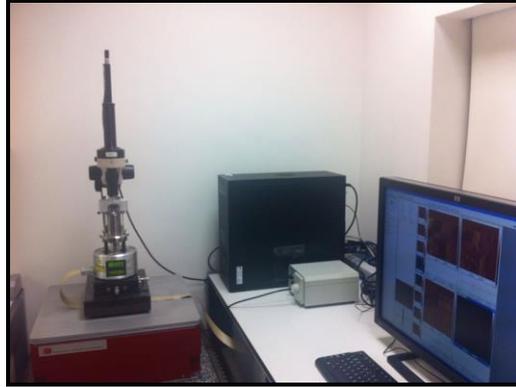


Figura III.10. Equipo para observar Microcopia de Fuerza Atómica

III.3.8. Difracción de Rayos X

Se obtuvieron los patrones de difracción utilizando un difractómetro de Rayos X (DRX, AXS/D8 Bruker Avance). Para este análisis, se cortaron 4 muestras de cada film en cuadrados de 4 cm y se montaron sobre una base de carbono, antes de su almacenamiento, con el fin de evitar la rotura durante la manipulación. Estas muestras de films se equilibraron en las condiciones previas descritas anteriormente y se analizaron entre 2θ : 5° y 2θ : 30° , utilizando radiación $\text{Cu K } \alpha$ (λ : $1,542 \text{ \AA}$), 40 kV y 40 mA con un tamaño de paso de $0,05^\circ$. Además se obtuvo el difractograma característico del lípido.

III.3.9. Análisis térmico (DSC)

Los termogramas de las muestras de film, acondicionadas durante 1 y 5 semanas (25°C y 53% de humedad relativa), se obtuvieron en un equipo DSC 1 Star[®] System marca Mettler Toledo (Switzerland), , tomando como referencia un crisol vacío. El equipo utilizó el programa EXTAR6000 Thermal Analysis Software.

Se realizaron diferentes barridos en los que se fueron cambiando las condiciones del barrido. Los pesos de muestra estuvieron entre 5,0 y 9,0 mg. Se utilizaron crisoles de aluminio. Las condiciones de temperatura y velocidad de calentamiento de cada barrido fueron: primer barrido de calentamiento de 25°C a 160°C a 50°C/min, segundo barrido de enfriamiento a de 160°C a 0°C a 50°C/min y el tercer barrido de calentamiento fue de 0°C a 200°C a 20°C/min. Todos los crisoles se pincharon en la tapa y se volvieron a pesar después del análisis calorimétrico, con el fin de determinar la pérdida de peso por pérdida del agua ligada de los films. Se realizaron cuatro repeticiones para cada formulación y tiempo de almacenamiento.



Figura III.11. Equipo de medición de calorimetría DSC

III.3.10. Efectividad antifúngica en los films secos aislados

Estas pruebas se realizaron para la determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales de canela, clavo y orégano frente a los mohos *Colletotrichum gloeosporoides* (CG) y *Fusarium oxysporum* (FOG), patógenos presentes de forma habitual en la papaya.

El cultivo madre de *Colletotrichum gloeosporoides* fue aislado de naranjo de Valencia (España) y proporcionado por Grupo de Investigación de Hongos Fitopatógenos del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia.

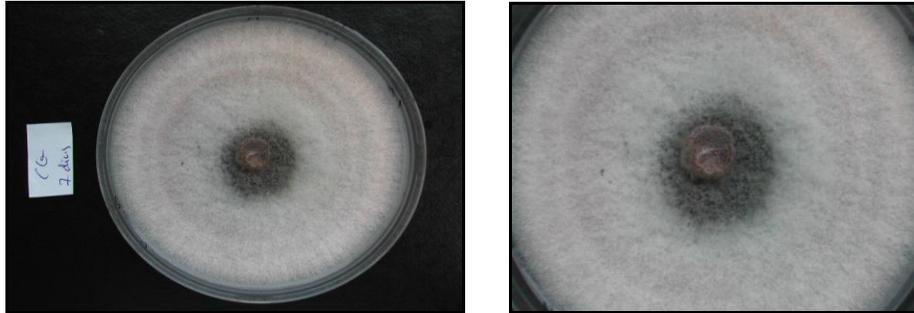


Figura III.12. Cultivo de *Colletotrichum gloeosporoides* de 7 días

El *Fusarium oxysporum* f.sp. gladiolo CECT 2868 fue de la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT, Burjassot, Spain). Estos se mantuvieron congelados, en Agar Patata Dextrosa (PDA, Scharlab, Barcelona, Spain), luego fueron incubados a 25°C hasta su esporulación, y se utilizaron a los 7 días de crecimiento activo.

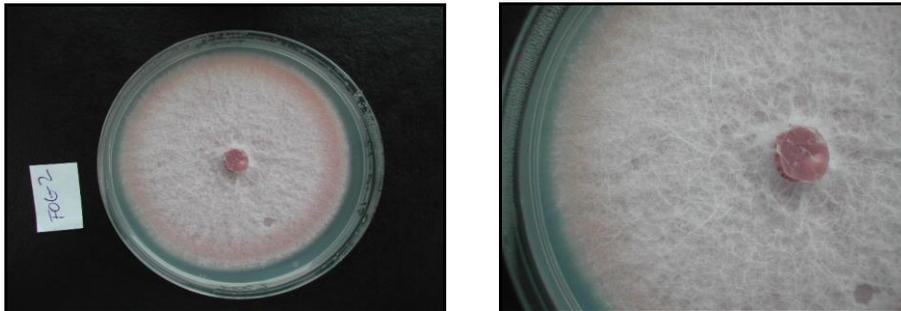


Figura III.13. Cultivo de *Fusarium oxysporum* de 7 días

La metodología utilizada para el ensayo *in vitro* fue una adaptación del método de difusión en agar descrita por Ponce y col. (2008). Se realizó una siembra por inclusión del cultivo del hongo patógeno. Para ello, se preparó una suspensión de esporas de aproximadamente 5×10^6 ufc/ml en agua con Tween 80 (0,1%), a partir de colonias de 7 días en crecimiento activo en medio PDA. Se añadieron 4 ml de la suspensión de esporas por cada medio litro de PDA en matraz, previamente esterilizado, y cuando el medio estaba a una temperatura de 45°C. Los matraces inoculados con el hongo se mantuvieron en agitación orbital 10 min a 170 rpm. Una vez repartido en placas se dejó solidificar, y a continuación se depositó el disco de film de 2,4 cm de diámetro, que contenía los films con los aceites esenciales de cada ensayo. Las lecturas se realizaron midiendo el halo de inhibición desde el centro del disco de film hasta el extremo de la superficie de inhibición, a las 48 y 72 horas. Se tomaron 2 medidas del diámetro de la superficie inhibida y se calculó la media. Se realizaron 6 repeticiones por tratamiento más dos controles, sin film y con film sin aceite esencial.

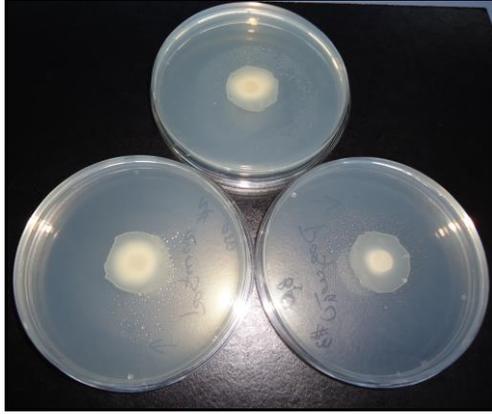


Figura III.14. Placas con sembrado por inclusión, con disco de film con aceite esencial

III.4. APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS A LA CONSERVACION DE PAPAYAS

Las formulaciones para el recubrimiento de las papayas contenían almidón, gelatina (50S-50G) y los aceites esenciales de orégano (O), clavo (CL) y canela (C). La proporción de polímero: aceite esencial fue 1:0,25, preparados tal y como se ha descrito en III.2.2.

Las papayas se adquirieron en el centro de acopio de frutas y vegetales en Montebello – Guayaquil, Provincia del Guayas en Ecuador para que fueran del mismo origen, periodo postcosecha, grado de madurez y similares condiciones de tamaño, color y peso. El índice de color de las papayas fue el estado de maduración N° 2. Piel verde con franjas amarillas bien definidas, la pulpa de color

naranja cerca de las semillas y de color verde claro cerca de la piel, y con gran cantidad de látex (Santamaría et al., 2009).



Figura III.15. Papayas en estado de maduración N° 2



Figura III.16. Corte de Papaya en estado de maduración N° 2

Las pruebas se hicieron con la variedad Maradol que se cosecha durante todo el año. Se seleccionaron las papayas de dimensiones similares (peso aproximado 2.500-3.100 g) sin alteraciones fisiológicas ni daños visibles. Para realizar la aplicación de los recubrimientos, las papayas se pesaron y se midieron las

dimensiones características para estimar la cantidad necesaria de formulación por unidad de fruta. Esta se calculó para que los sólidos depositados sobre la superficie de la fruta fueran comparables a los que contenía el film seco aislado. La aplicación de las formulaciones sobre la superficie de la fruta se realizó por pulverización. Fueron necesarias 6 aplicaciones sucesivas (pulverización-secado), para obtener entorno a 4 mg de recubrimiento/fruta equivalentes a 3,5-4 μm de espesor. El secado de cada aplicación se realizó en condiciones ambientales.

Antes de iniciar estos ensayos, se comprobó la posible fitotoxicidad de las formulaciones con los aceites esenciales. Para ello se aplicaron las formulaciones sobre una muestra de papaya y se observó visualmente la posible fitotoxicidad de los componentes sobre la piel de las papayas a las 24 horas de la aplicación.



Figura III.17. Papaya a las 24 horas de aplicación del recubrimiento

En las papayas recubiertas (y en la control-sin recubrir), almacenadas en las condiciones ambiente de Ecuador (20°C y 90% de HR), se realizaron 2 tipos de ensayos.

Efectividad antifúngica. Para ello, antes de la aplicación de los recubrimientos, las papayas se infectaron con los 2 hongos característicos mencionados anteriormente (CG y FOG). Se evaluó diariamente, en cada caso, el número de frutos afectados por la infección y la evolución del diámetro de la alteración en función del tiempo.

Calidad de papayas recubiertas. Para ello, se aplicaron las formulaciones en frutos de papaya sin infectar. Se evaluaron los parámetros de calidad (pérdida de peso, color, textura, sólidos solubles, pH, acidez) de las papayas recubiertas a diferentes tiempos de almacenamiento.

III.4.1. Efectividad antifúngica de los recubrimientos

Las papayas, previamente seleccionadas, se lavaron con una disolución de hipoclorito sódico (2% v/v), se enjuagaron y se dejaron secar al aire. Se reservaron como control muestras de papaya sin limpiar y desinfectar, tal y como llegaron del centro de acopio, para simular la infección natural con la que venían de campo (10 frutos-CONTROL 1).

El resto de papayas se infectaron siguiendo el procedimiento siguiente. Se realizaron incisiones de 2 mm de profundidad (6 incisiones/fruto) y con un asa de platino se depositó en la incisión una masa conocida de micelio fresco de cultivo de 7 días de crecimiento activo de cada uno de los hongos. Se realizaron un total de 60 incisiones como puntos de control para evaluar la evolución de la infección. Se dejaron las papayas 12 h para que el patógeno se instaurara en el fruto y después se procedió a la aplicación de los recubrimientos de almidón-gelatina con los aceites esenciales, tal y como se ha descrito anteriormente. Se consideró otro control que fueron papayas limpias, infectadas sin recubrir (10 frutos-CONTROL 2).

III.4.2. Calidad de papayas recubiertas

Las papayas, previamente seleccionadas, se lavaron con una disolución de hipoclorito sódico (2% v/v), se enjuagaron y se dejaron secar al aire. Después se recubrieron las papayas (5 frutos/formulación) con las formulaciones de almidón-gelatina y aceites esenciales (O, CL y C), tal y como se ha descrito anteriormente. Se consideró como control muestras de papayas limpias y sin recubrir (5 frutos-CONTROL 2).

Todas las papayas se almacenaron en condiciones ambientales de Ecuador (20°C y 90% HR) y se evaluaron las siguientes propiedades fisicoquímicas en los frutos a lo largo del almacenamiento.

Pérdida de peso

Se pesaron las papayas antes y a diferentes tiempos de almacenamiento con una balanza ($\pm 0,001$ g) para evaluar las pérdidas de peso. Se realizaron 3 repeticiones.

Firmeza

Se realizaron medidas de punción usando un analizador de textura Brookfield CT3 Analyzer Version 1.2 (Surrey, Reino Unido) con un límite de fuerza de 4,5 kg. La velocidad de deformación fue de 0,5 mm/s hasta alcanzar una carga de 0,067 N.

Las papayas se partieron por la mitad y se realizaron ensayos en muestras de papaya sin piel y con piel. Para las muestras sin piel se utilizó un punzón de acero inoxidable de diámetro 12,7 mm (TA5) y para las muestras con piel de 6,5 mm (TA41).

Se realizaron 10 penetraciones/fruto, tanto en los extremos como en el centro o cuerpo de la papaya. Posteriormente se licuaron las papayas para la determinación, por triplicado, de su composición: contenido de agua, sólidos solubles y acidez.

Contenido en agua

Se utilizó el método gravimétrico AOAC 18th 920.151 que consiste en determinar la pérdida de peso de una masa conocida de fruta (aproximadamente 20 g) por secado en estufa de convección al vacío, a 70°C.

Acidez

Los análisis de acidez se hicieron por valoración (AOAC 18th 942.15) en muestras licuadas y filtradas de papaya. Para ello, se valoró el zumo obtenido con una solución de NaOH 0,1N controlándose el punto final hasta alcanzar un pH de 8,1. El pH-metro utilizado fue el Modelo GLP 21+ (Crison, Barcelona). Los resultados fueron expresados en g de ácido cítrico por 100 g de zumo.

Sólidos solubles

Se midieron a través de los grados Brix según el método AOAC 18th 932.14C mediante un refractómetro Modelo 3T ABBE (ATAGO Co Ltd., Japón) termostato a 18°C.

Color

El color de las papayas se evaluó sensorialmente por comparación con pantones (Proyector Color Solid to process Pantone® Process Color Imaging Guide). Las coordenadas CIE L*a*b* del pantón seleccionado en cada caso se utilizaron para las comparaciones entre muestras, cinco repeticiones.

IV. CAPITULO 1
PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS DE
ALMIDÓN DE YUCA-GELATINA

IV.1.1. MICROESTRUCTURA

La microestructura final del film depende de las interacciones de sus componentes y de las condiciones de secado de las dispersiones formadoras de film y tiene un gran impacto en las propiedades de los films. El análisis microestructural aporta información relevante acerca de la organización de los componentes, y en definitiva, ayuda a comprender los valores obtenidos para las propiedades barrera, mecánicas y ópticas de los films.

Previo al análisis de las propiedades físicas, se analizó la estructura interna y de la superficie de los films por la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM) para una mejor comprensión de los valores de sus propiedades físicas.

En las figuras IV.1.1 y IV.1.2 se muestran las micrografías obtenidas para las superficies y secciones transversales, respectivamente, de los films estudiados. En la columna de la izquierda se pueden observar las cuatro formulaciones con almidón y gelatina sin lípido y en la columna de la derecha, las correspondientes con lípido. En general, las micrografías de los films almidón puro presentaron micro roturas debido al impacto de los electrones, lo que revela la gran fragilidad de los mismos.

En las micrografías de la superficie y corte transversal de los films de almidón puro (100S-0G) se puede observar una estructura compacta y homogénea, lo que indica que la gelatinización fue completa y no

quedan gránulos. Se observan algunos puntos blanquecinos aislados que podrían estar relacionados con el glicerol que ha quedado parcialmente incorporado a la matriz de almidón, como ha sido descrito en trabajo previos (Jiménez et al., 2012).

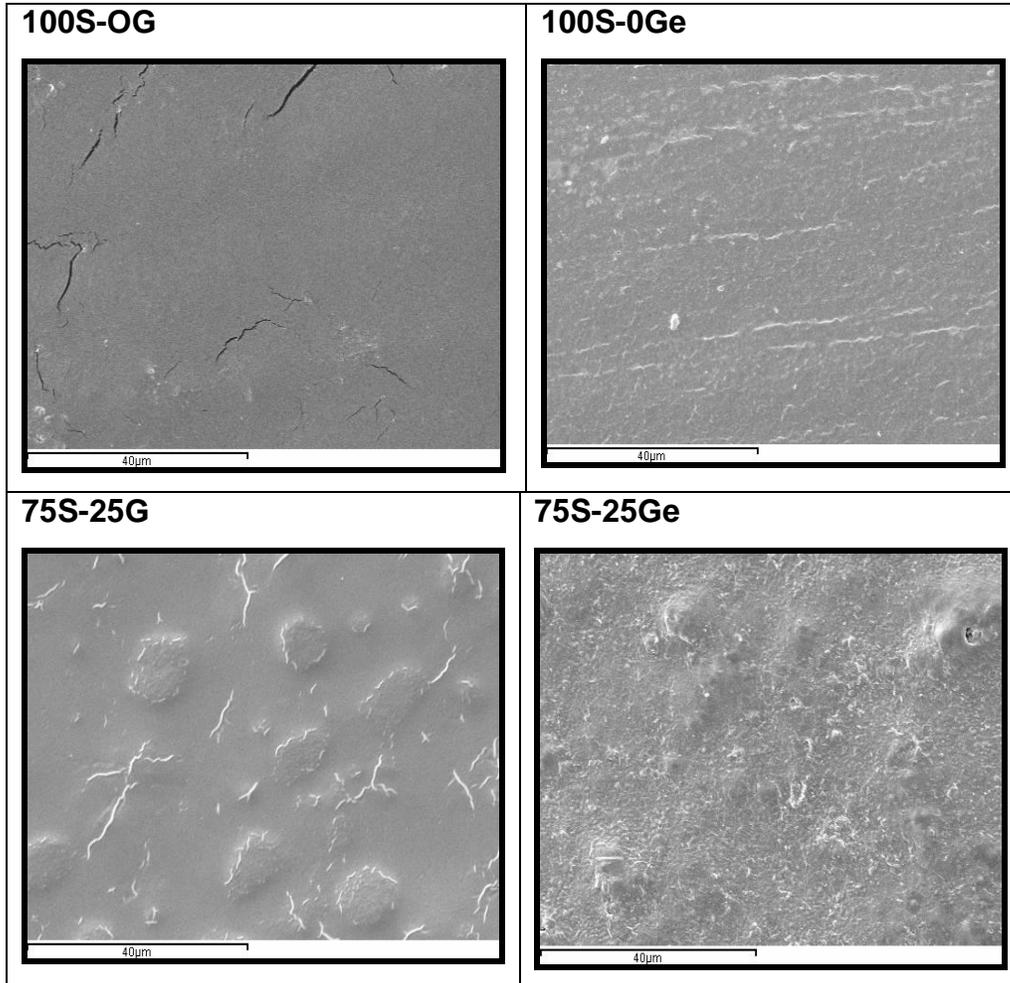


FIGURA IV.1.1 Micrografías SEM de la superficie de films de almidón y gelatina puros y mixtos (1500 aumentos): sin lípido (izquierda) y con lípido (derecha) E471

(Continua)

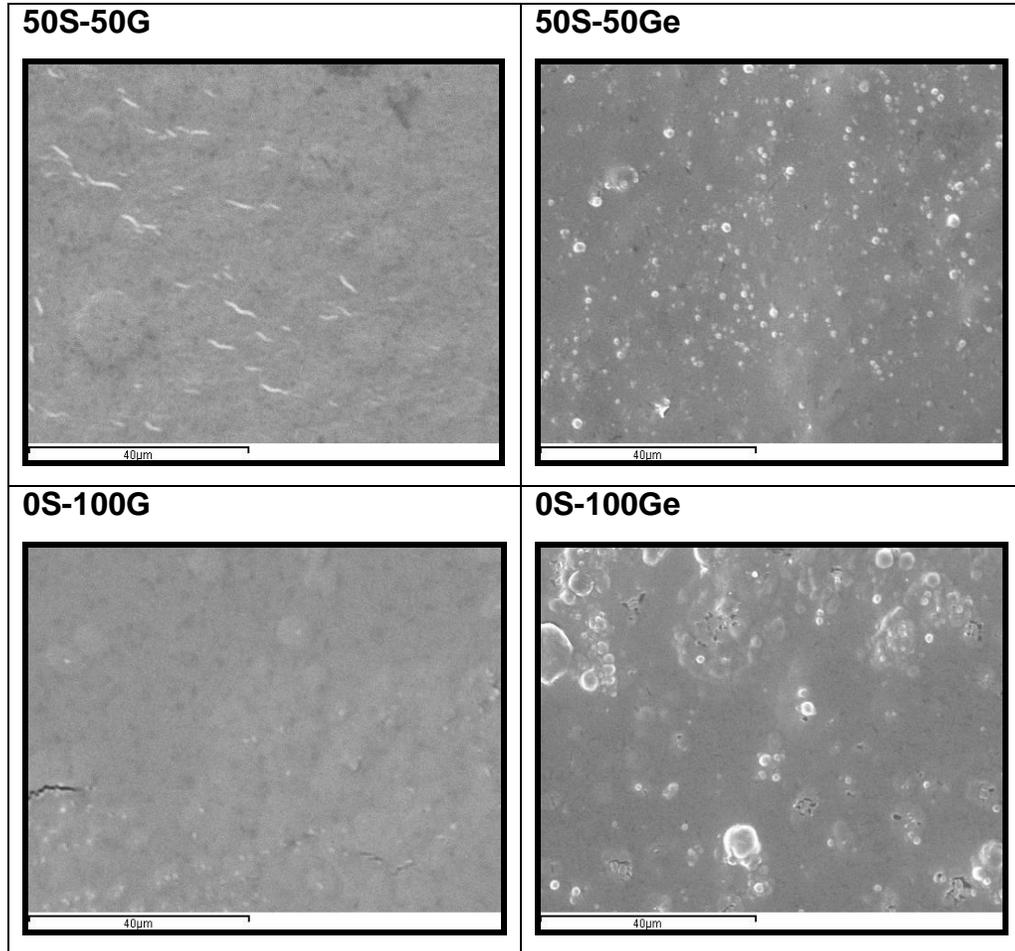


FIGURA IV.1.1 Micrografías SEM de la superficie de films de almidón y gelatina puros y mixtos (1500 aumentos): sin lípido (izquierda) y con lípido (derecha) E471

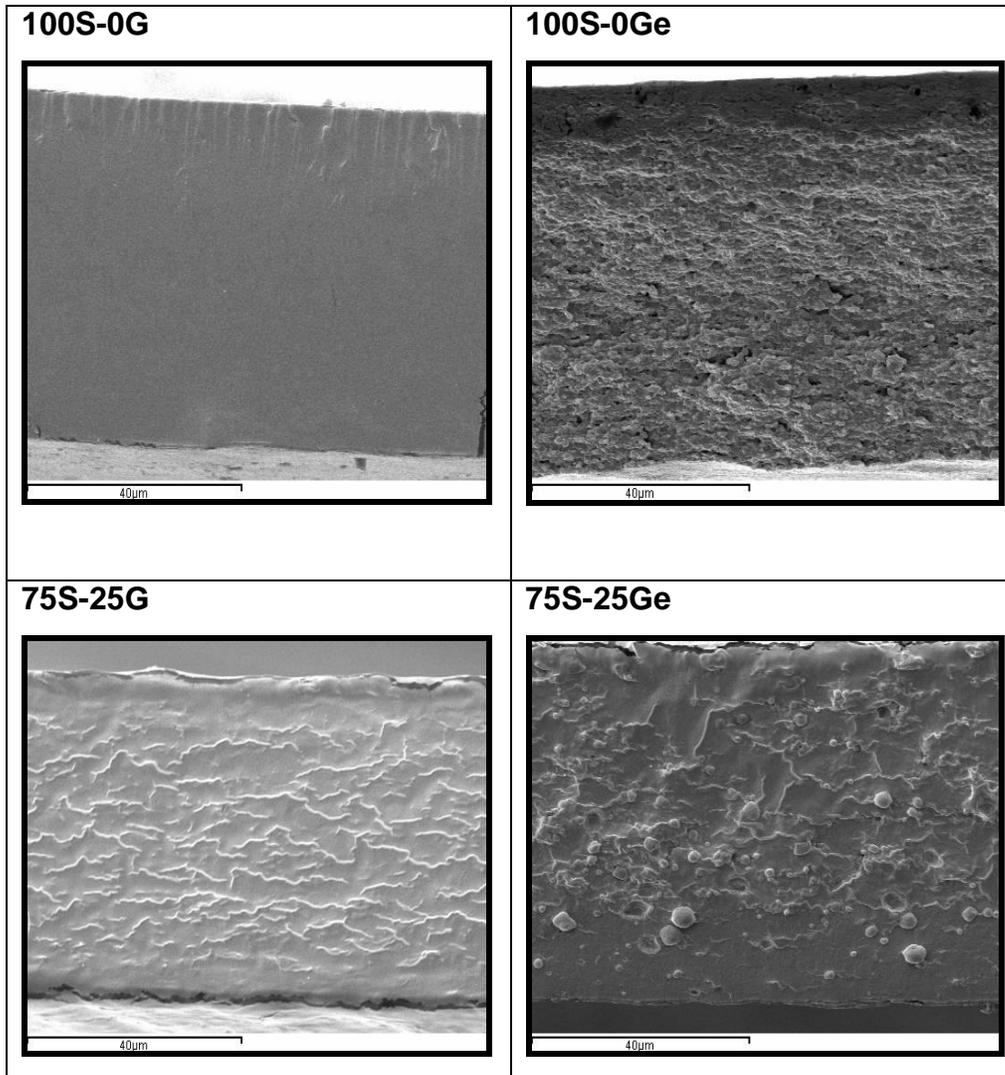


FIGURA IV.1.2 Micrografías SEM del corte transversal de films de almidón y gelatina puros y mixtos (1500 aumentos): sin lípido (izquierda) y con lípido (derecha) E471

(Continua)

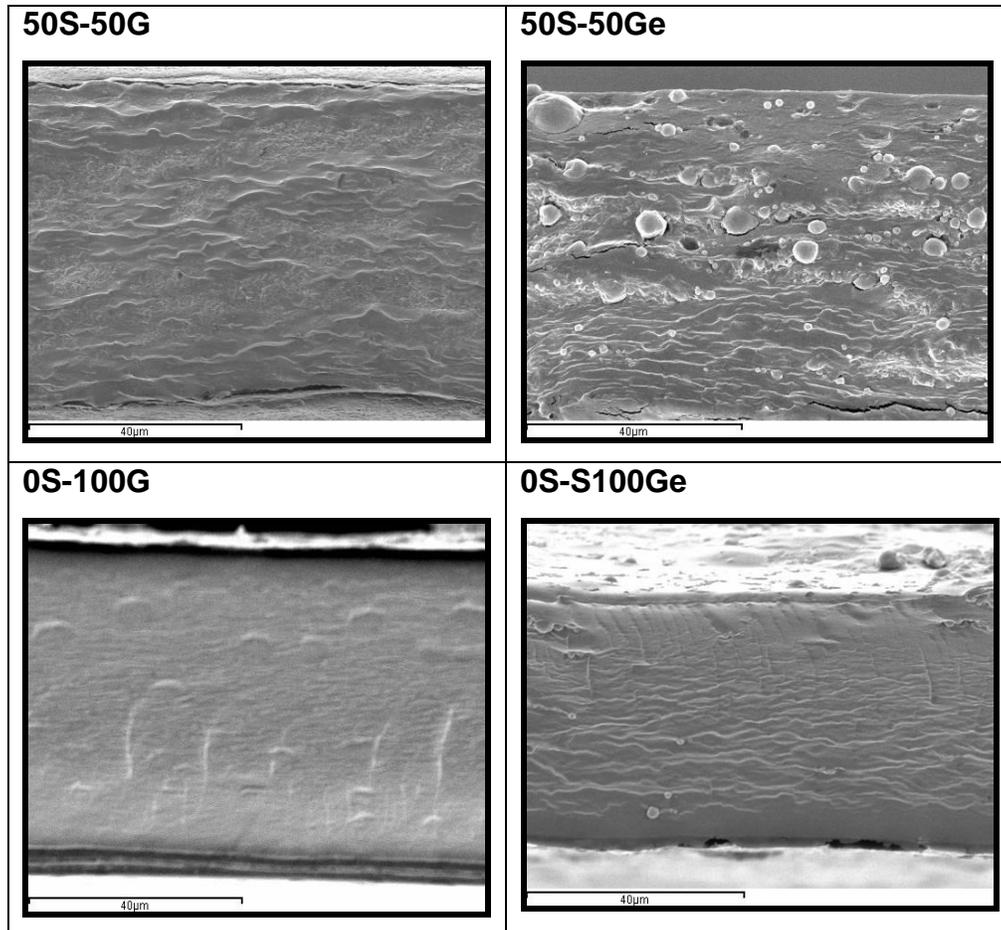


FIGURA IV.1.2 Micrografías SEM del corte transversal de films de almidón y gelatina puros y mixtos (1500 aumentos): sin lípido (izquierda) y con lípido (derecha) E471

Los films de gelatina pura (0S-100G), muestran también estructura compacta, bastante homogénea y con superficies continuas lisas, sin poros, descritas en otros trabajos (Ahmad et al., 2012). Se observan

también algunos puntos blanquecinos aislados relacionados con la presencia de glicerol separado de la matriz continua. Además se identifican zonas redondeadas y abombadas en la superficie y en el interior de la matriz continua del film. Esto puede estar relacionado con zonas de reorganización de las cadenas de proteína, que se reagrupan en forma helicoidal durante el secado de los films en forma similar al colágeno (Hassan y Norziah, 2012 - 2013). En la sección transversal, el film de gelatina pura (OS-100G) muestra zonas de alineamiento de las cadenas, asociadas a los fenómenos de entrelazado de las triples hélices, recuperando la conformación propia del colágeno.

La apariencia lisa de los polímeros puros cambia al añadir el lípido, que introduce discontinuidades en la matriz por la falta de miscibilidad de los componentes. Estas irregularidades se aprecian tanto en la superficie como en el corte transversal del film de ambas matrices. En la gelatina se aprecia una superficie más heterogénea (gotas lipídicas de gran tamaño separadas de la matriz) mientras que la estructura interna del almidón es altamente quebradiza aunque no se observan partículas lipídicas aisladas sino un tipo diferente de empaquetamiento en la matriz.

Hassan y Norziah (2012), describieron para films de gelatina morfologías estructurales similares a las observadas en este trabajo: films homogéneos, superficies lisas y continuas, de aspecto esponjoso, con zonas discontinuas en los cortes transversales

caracterizados por grietas distribuidas a lo largo sección de la matriz. Estas zonas discontinuas están relacionadas con canales preferentes de secado. En matrices de gelatina, Bertan et al., 2005 estudiaron el efecto de incorporar ácidos grasos. Las observaciones microestructurales mostraron que la incorporación de los ácidos grasos a la matriz no fue totalmente homogénea. Además, el estudio calorimétrico también mostró más de una temperatura de transición vítrea, indicando por tanto la separación de fases.

Las superficies de los films mixtos (75S-25G / 50S-50G) son heterogéneas y muestran zonas irregulares (redondeadas y abombadas), relacionadas con fenómenos de agrupación-entrecruzamiento de la doble hélice del colágeno tras el secado. En las secciones transversales se observan zonas de alineación de las cadenas de los polímeros, embebidas en la matriz amorfa de almidón, lo que refleja poca compatibilidad entre los dos polímeros. Estas zonas fibrosas han sido descritas en trabajos previos de films de gelatina y se corresponden con las zonas de asociación de cadenas de gelatina a través de sus regiones helicoidales (Hassan y Norziah, 2012).

La adición del lípido a los films mixtos supuso la formación heterogeneidades tanto a nivel interno como superficial; a mayor proporción de gelatina, mayor heterogeneidad del film. Esto indica no solo poca compatibilidad entre ambos polímeros sino problemas de miscibilidad asociados también con la presencia del lípido. Estos

aspectos han sido descritos por Hassan et al. (2009 y 2012) en geles de almidón-gelatina. Hassan y Norziah (2012) analizaron el efecto de la mezcla de diferentes proporciones de almidón de sagú - gelatina de pescado (1:0, 2:1, 3:1, 4:1, and 5:1) sobre las propiedades de los films. Las observaciones microestructurales mostraron films de superficies más lisas a medida que descendía el contenido en proteínas de las muestras.

En cuanto a sistemas almidón-proteínas-lípidos, Wongsasulak et al., (2006) han estudiado el efecto del contenido en agua de films compuestos de almidón de yuca, albumen y aceite de girasol en las propiedades microestructurales. Las imágenes SEM mostraron heterogeneidad y que la microestructura de la matriz mixta cambia con el contenido en agua y la temperatura de calentamiento. A mayor contenido en agua, mayor heterogeneidad de la matriz, lo que está relacionado con el nivel de empaquetamiento de las moléculas de biopolímero.

En conclusión, las imágenes descritas para los films de los polímeros puros del presente estudio son comparables con lo observado por otros autores. En cuanto a los films mixtos parecen observarse dos fases: una rica en almidón y otra rica en gelatina, con escasa compatibilidad entre los polímeros. Esta falta de compatibilidad parece agudizarse en presencia de lípidos. La incorporación del lípido supuso una escasa miscibilidad con la matriz polimérica en ambos polímeros casos y en los films mixtos. El efecto del lípido en

la matriz de almidón muestra morfologías muy diferentes con respecto al de la gelatina, probablemente por la formación de complejos con las cadenas de amilosa y amilopectina, lo cual no parece ocurrir en la matriz de proteína, donde se observa mucho más integrado que en los films mixtos.

IV.1.2. PROPIEDADES ÓPTICAS Y BRILLO

Según Hutchings (1999), el nivel de transparencia u opacidad y el brillo son las propiedades ópticas de mayor relevancia para evaluar el impacto de un recubrimiento sobre la apreciación del aspecto del producto recubierto. Las propiedades ópticas se encuentran directamente relacionadas con la microestructura del film. El brillo depende de la topografía superficial y la transparencia de la heterogeneidad interna de la estructura. Así, valores elevados de la transmitancia interna (T_i), se relacionan con una mayor homogeneidad estructural y films más transparentes (Villalobos *et al.*, 2005).

En la tabla IV.1.1 se muestran los valores de T_i a 480 nm y el brillo de las diferentes formulaciones medidos a un ángulo de incidencia de 60° . Se seleccionó la longitud de onda de 480 nm para comparar las muestras porque en la distribución espectral se encontraron las mayores diferencias entre ellas a esta longitud de onda.

Tabla IV.1.1 Transmitancia interna (Ti) y Brillo 60° de films de almidón de yuca y gelatina, puros y mixtos, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C y 53%de HR. Valores medios (desviación estándar) y resultados del ANOVA.

FILMS	Ti 480nm (%)		Brillo 60°	
	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas
100S-0G	87,1(0,3) ^{(a)(x)(1)}	85,8(0,08) ^{(a)(x)(2)}	18(5) ^{(cd)(x)(1)}	16(4) ^{(a)(x)(1)}
100S-0Ge	84,86(0,09) ^{(c)(y)(1)}	84,66(0,12) ^{(b)(y)(1)}	11(2) ^{(e)(y)(1)}	16(2) ^{(a)(y)(2)}
75S-25G	85,8(0,3) ^{(b)(x)(1)}	85,8(0,2) ^{(a)(x)(1)}	24,6(1,8) ^{(c)(x)(1)}	9,6(0,8) ^{(bc)(x)(2)}
75S-25Ge	84,243(0,002) ^{(d)(y)(1)}	83,98(0,07) ^{(cd)(y)(1)}	11,3(0,9) ^{(e)(y)(1)}	7,4(0,8) ^{(c)(y)(2)}
50S-50G	85,8(0,04) ^{(b)(x)(1)}	84,54(0,15) ^{(bc)(x)(2)}	37(4) ^{(b)(x)(1)}	15(3) ^{(a)(x)(2)}
50S-50Ge	84,6(0,2) ^{(cd)(y)(1)}	83,7(0,2) ^{(d)(y)(2)}	14(2) ^{(de)(y)(1)}	10,7(0,3) ^{(b)(y)(2)}
0S-100G	85,5(0,2) ^{(b)(x)(1)}	84,7(0,2) ^{(b)(x)(1)}	75(15) ^{(a)(x)(1)}	32(3) ^{(a)(x)(2)}
0S-100Ge	83,6(0,12) ^{(e)(y)(1)}	82,79 (0,09) ^{(e)(y)(1)}	10,0(0,2) ^{(e)(y)(1)}	8,7(0,3) ^{(bc)(y)(2)}

a, b, c, d, e, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices dentro de una misma formulación indican diferencias significativas con y sin adición de lípido E471(e). ($p < 0.05$).

1, 2, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

Los valores de Ti y brillo obtenidos son comparables con los referenciados para gelatina (Bertan et al., 2005) y almidón (Jiménez et al., 2012) en trabajos previos.

Transparencia

En general, los valores de Ti de todos los films fueron muy similares, oscilando entre 84-87 %. Los films de almidón fueron los más transparentes a los dos tiempos de almacenamiento estudiados, en coherencia con la mayor homogeneidad de la estructura, observada en los cortes transversales de los films.

La incorporación del lípido disminuyó la transparencia (menor Ti) de todos los films, a los dos tiempos de almacenamiento, lo que es atribuible a heterogeneidad interna de la estructura del film, comentada anteriormente, y en coherencia con lo descrito por otros autores al incorporar lípidos a la matriz polimérica (Sánchez-González et al., 2010). Los compuestos de naturaleza lipídica al no ser compatibles con el polímero, se encuentran en una fase dispersa partículas de diferente tamaño que promueve la dispersión de la luz, confiriendo opacidad a los films. En este sentido, Jiménez et al. (2012) observaron disminuciones de Ti al incorporar ácidos grasos a matrices de almidón de maíz.

Al aumentar el tiempo de almacenamiento, los valores de Ti tienden a disminuir, siendo este descenso más acusado en los films de

almidón puro. Este efecto también ha sido observado por Jiménez et al. (2012) durante el envejecimiento de films de almidón de maíz con ácidos grasos, y se ha relacionado con la formación de zonas cristalinas de mayor tamaño, con índices de refracción diferentes a la fase amorfa. No obstante, en la mayoría de los casos el descenso con el tiempo no es significativo, podría atribuirse a un incremento en la compacidad de la matriz por la agregación progresiva de las cadenas poliméricas.

Brillo

El brillo inicial de los films estuvo muy influenciado por su composición, siendo muy diferente entre los films de gelatina (75), que son los más brillantes, y los de almidón (18) que presenta el menor valor de brillo y un aspecto mate. A tiempo inicial, la incorporación de gelatina a la matriz de almidón, supuso un aumento significativo ($p < 0.05$) del brillo de los films, de forma proporcional a su proporción en matriz. Sin embargo, este efecto no se observó cuando los films contenían lípido o a las 5 semanas de almacenamiento. Esto pone de manifiesto que ambos factores introducen cambios estructurales (fenómenos de asociación, reorganización, cristalización etc.) que afectan a la topografía de la superficie de los films.

La incorporación del lípido provocó la disminución del brillo de los films lo que se atribuye a la presencia superficial de partículas lipídicas que aumentan la rugosidad de la superficie. Los fenómenos de agregación de los lípidos y cremado durante el secado de los films potencia la migración de las partículas a la superficie, lo que favorece la presencia de partículas lipídicas en la interface film-aire y la heterogeneidad superficial (Villalobos et al., 2005). Esta disminución del brillo fue muy marcada en los films de gelatina pura con una reducción de casi 60%, lo que es coherente con las imágenes superficiales descritas anteriormente para films de gelatina con y sin lípido, y con los resultados previos descritos por Bertan et al. (2005). El envejecimiento de los films, no produjo cambios significativos de su brillo en los films de almidón puro o con lípido. Un efecto similar ha sido descrito por Jiménez et al. (2012) durante el envejecimiento de films de almidón de maíz con ácidos grasos. Por el contrario, el tiempo de almacenamiento provocó un descenso significativo en aquellos films que contienen gelatina sin lípido, tanto pura como en las mezclas almidón-gelatina. Estos resultados indican que en los films de gelatina se producen cambios estructurales durante el almacenamiento y que afectan a la topografía superficial de los films. Con lípido, estos cambios tienen un menor reflejo sobre el brillo, pero debido a su bajo valor inicial, podrían no reflejarse de forma tan sensible en los cambios de brillo. En el almidón puro, estos cambios podrían verse frenados por su composición con un bajo contenido en

amilosa, que retrograda rápidamente, y su alto contenido en amilopectina, que retrograda muy lentamente.

En trabajos previos de films de almidón de maíz en los que se analizó la influencia del tiempo y la incorporación de otros componentes como caseinatos (Jiménez et al., 2012) y HPMC (Jiménez et al., 2012), se encontraron resultados diversos en las propiedades ópticas. La incorporación de caseinato sódico a films de almidón provocó un ligero incremento de la transparencia y una pérdida de brillo. En cuanto a la incorporación de HPMC, se observó un descenso del brillo, que en este caso se correlaciona con la separación de fases entre ambos polímeros. Estos cambios están fundamentalmente relacionados con las propiedades ópticas que aportan los componentes iniciales con los que se mezcla el almidón, con la compatibilidad e interacciones entre ambos y los fenómenos de reorganización de estos componentes durante el tiempo, y que afectan a la topografía superficial y a la estructura interna de los films. En ambos casos, la mezcla con estos polímeros (caseinatos y HPMC) parece frenar los cambios que ocurren durante el envejecimiento de los films de almidón de maíz, en especial la retrogradación.

IV.1.3. PROPIEDADES BARRERA

En la tabla IV.1.2, se muestran las medias, desviaciones y resultados del ANOVA de la permeabilidad al vapor de agua (PVA), permeabilidad al oxígeno (PO), la humedad (x_w) y el espesor (μm) en los diferentes films secos formulados a partir de almidón (S) gelatina (G) y lípido (e), a tiempo inicial y final de almacenamiento, 1 y 5 semanas respectivamente. Los films se almacenaron a 25°C y una humedad relativa de 53%.

Los valores de humedad de los films descritos en la tabla IV.1.2, reflejan pocos cambios y los niveles oscilaron entre 8,5-11% (b.h.). En general el contenido en agua de los films aumenta con la incorporación de gelatina y disminuye al añadir el lípido, lo que es coherente con la diferente afinidad con el agua de ambos ingredientes.

Permeabilidad al vapor de agua

En general, los valores de PVA reflejan tendencias coherentes con los valores de humedad comentados. A tiempo inicial, los films de almidón y gelatina puros tienen los valores más altos de PVA, como cabe esperar por tratarse de materiales muy higroscópicos, sobre todo la gelatina.

Tabla IV.1.2 Permeabilidad al vapor de agua (PVA), permeabilidad al oxígeno (PO), Humedad (x_w) y espesor (μm) de films de almidón de yuca y gelatina, puros y mixtos, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C a HR 53%. Valores medios (desviación estándar) y resultados del ANOVA.

FILMS	PVA ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{KPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)		PO ($10^{-13}\text{ cm}^3\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)		x_w (% b.h.)		Espesor (μm)	
	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas
100S-0G	5,4(0,4) ^{(bc)(x)(1)}	6,8(0,5) ^{(a)(x)(2)}	0,395(0,002) ^{(f)(x)(1)}	0,253(0,0013) ^{(g)(x)(2)}	8,8(0,7) ^{(bc)(x)(1)}	7,6(0,2) ^{(d)(x)(2)}	75(4) ^{(a)(x)(1)}	65(4) ^{(d)(x)(2)}
100S-0Ge	2,70(0,3) ^{(d)(y)(1)}	1,9(0,5) ^{(g)(y)(2)}	2,51(0,23) ^{(a)(y)(1)}	1,960(0,33) ^{(a)(y)(1)}	7,7(0,8) ^{(c)(x)(1)}	8,6(0,8) ^{(bcd)(x)(1)}	76(4) ^{(a)(x)(1)}	74(4) ^{(a)(y)(2)}
75S-25G	6,2(0,7) ^{(a)(x)(1)}	6,4(0,7) ^{(ab)(x)(1)}	0,494(0,009) ^{(f)(x)(1)}	0,379(0,002) ^{(ef)(x)(1)}	8,92(1,08) ^{(bc)(x)(1)}	8,8(0,3) ^{(bc)(x)(1)}	67(5) ^{(c)(x)(1)}	71(6) ^{(b)(x)(2)}
75S-25Ge	6,4(0,8) ^{(a)(x)(1)}	5,2(0,3) ^{(de)(y)(2)}	1,330(0,007) ^{(d)(y)(1)}	0,600(0,002) ^{(cd)(y)(2)}	8,5(0,5) ^{(bc)(x)(1)}	8,0(0,6) ^{(cd)(y)(1)}	70(6) ^{(b)(y)(1)}	74(4) ^{(a)(y)(2)}
50S-50G	5,9(0,4) ^{(ab)(x)(1)}	5,9(0,6) ^{(bc)(x)(1)}	0,52(0,09) ^{(f)(x)(1)}	0,270(0,0013) ^{(ef)(x)(2)}	10(2) ^{(ab)(x)(1)}	10,8(1,3) ^{(a)(x)(1)}	74(3) ^{(a)(x)(1)}	68(3) ^{(e)(x)(2)}
50S-50Ge	5,2(0,2) ^{(c)(y)(1)}	3,8(0,2) ^{(f)(y)(2)}	1,520(0,005) ^{(c)(y)(1)}	0,860(0,0028) ^{(bc)(y)(2)}	9,9(0,4) ^{(bc)(x)(1)}	9,3(0,6) ^{(b)(x)(1)}	71(2) ^{(b)(y)(1)}	60(2) ^{(e)(y)(2)}
0S-100G	6,3(0,5) ^{(a)(x)(1)}	5,5(0,4) ^{(de)(x)(2)}	0,75(0,06) ^{(e)(x)(1)}	0,487(0,0) ^{(ef)(x)(2)}	10,9(1,9) ^{(a)(x)(1)}	11(0,5) ^{(a)(x)(1)}	66(3) ^{(c)(x)(1)}	68(4) ^{(c)(x)(1)}
0S-100Ge	5,3(0,2) ^{(bc)(y)(1)}	4,8(0,5) ^{(e)(x)(1)}	1,88(0,07) ^{(b)(y)(1)}	0,975(0,0) ^{(b)(y)(2)}	9,9(0,7) ^{(ab)(x)(1)}	10,6(0,6) ^{(a)(x)(1)}	75(3) ^{(a)(y)(1)}	72(4) ^{(ab)(y)(2)}

a, b, c, d, e, f, g. Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices dentro de una misma formulación indican diferencias significativas con y sin adición de lípido E471(e). ($p < 0.05$).

1, 2, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

Estos resultados son comparables con los descritos en estudios previos en films almidón de yuca (Mali et al., 2006) y gelatina de bovino (Bertan et al., 2005). En general, los valores de PVA de los films oscilan entre 5,4 y 6,3 $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{KPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. En los films mixtos, no se observan cambios significativos en los valores de PVA, en comparación con los polímeros puros. Esto indica que la incorporación de gelatina bovina a la matriz de almidón de yuca, no afecta negativamente a esta propiedad barrera en las proporciones del ensayo. En trabajos previos también se describieron pocos cambios en la PVA al añadir caseinato y HPMC a films de almidón (Jiménez et al., 2012). No obstante, en trabajos previos Hassan y Norziah (2012) si describieron un efecto negativo sobre esta propiedad, al incorporar gelatina de pescado a almidón sagú.

En general la incorporación del lípido, mejoró la propiedad barrera al agua de todos los films a los dos tiempos de almacenamiento, como es lógico por su naturaleza hidrofóbica. La misma tendencia ha sido observada en estudios previos al añadir ácidos grasos a films de almidón de maíz (Jiménez et al., 2012) y gelatina (Bertan et al., 2005), o aceite de oliva a films de gelatina (Wen et al., 2012). Este efecto fue muy notable ($p < 0.05$) en el caso de los films de almidón, con una reducción de la PVA mayor del 60%. Esto puede estar relacionado con interacciones específicas del lípido con los polímeros del almidón debido a la formación de complejos amilosa-lípido y/o amilopectina-lípido, descrita por diferentes autores (Jiménez et al.,

2012), lo que permite una mayor integración del lípido en la matriz de almidón.

La mejora de la propiedad de barrera al vapor de agua de los films de almidón o gelatina con la incorporación del lípido es coherente con las observaciones microestructurales, que revelan matrices continuas, sin zonas porosas. No obstante, estas mejoras no se observan al incorporar el lípido a los films mixtos seguramente por problemas de compatibilidad en el sistema lípido-almidón-gelatina.

En general, el envejecimiento del film con el tiempo de almacenamiento mostró comportamientos muy diferenciados en los films. En los films de almidón puro aumenta ligeramente su permeabilidad con el tiempo, mientras que en los de gelatina disminuye. Los films mixtos sin lípido apenas sufren cambios en el valor de PVA. Sin embargo todos los films que incorporan lípido mejoran en esta propiedad barrera. Esto podría relacionarse con cambios en la integración de los hidrocoloides y el lípido en la matriz dando lugar a una red con más dificultades para el transporte de moléculas de agua. Trabajos previos en los que se incorporaban lípidos a matrices poliméricas, indican su efecto potenciador de las propiedades barrera al vapor de agua por fenómenos de asociación entre los compuestos (Gontard et al., 1993; Yang y Paulson, 2000).

Se observan concordancia entre los cambios en las propiedades ópticas y las de barrera al vapor de agua: los cambios en las propiedades ópticas con el tiempo revelan la formación de

estructuras más compactas, en especial por efecto de la incorporación del lípido y en el almidón, lo cual también redundaría en una disminución de las propiedades de transporte de masa.

Permeabilidad al oxígeno

Los films de gelatina presentan valores de PO casi el doble respecto a los de almidón, como se observa en la tabla IV.1.3. Estos resultados son comparables con los descritos en estudios previos realizados por Bertan et al. (2005) y Hassan y Norziah, (2012). En los films mixtos, la incorporación de la gelatina provoca resultados diferentes: en los films sin lípido aumenta la PO, aunque este efecto es menos marcado a las 5 semanas de almacenamiento y, por el contrario, al añadir lípido disminuye la PO a los 2 tiempos de almacenamiento. La incorporación de caseinatos y HPMC a films de almidón de maíz (Jiménez et al., 2012b) también disminuyó la barrera al oxígeno, al incorporar a la matriz otro polímero más permeable que el almidón.

La incorporación del lípido a las formulaciones provocó un aumento significativo de la PO en todos los films. Esto está relacionado con la mayor solubilidad del oxígeno en la fracción lipídica que promueve el transporte del gas (Fabra et al., 2012). Las irregularidades estructurales que introducen los lípidos en las matrices poliméricas, también pueden contribuir a este efecto se ha descrito en trabajos

previos en films de almidón (Jiménez et al., 2012a) y gelatina (Bertan et al., 2005).

El envejecimiento de los films supuso una disminución significativa ($p < 0.05$) de la permeabilidad al oxígeno debido posiblemente al aumento de las interacciones intercadena y compactación de la matriz, ya comentada previamente. En el caso de los films que contienen almidón, la mejora puede ser debida a la formación progresiva zonas cristalinas, que actúan de mayor barrera al paso del oxígeno (Shen et al., 2010).

IV.1.4. PROPIEDADES MECÁNICAS

En la figura IV.1.3 se muestra la evolución típica de la relación esfuerzo de tensión-deformación de Henky para las diferentes muestras estudiadas, donde puede observarse una importante diferencia de comportamiento en función de la formulación.

Destacan los mayores valores de la relación tensión-deformación relativa para los films de gelatina y su disminución progresiva a medida que aumenta la proporción del almidón en la mezcla.

Así mismo, en las figuras IV.1.4 a IV.1.6 se muestra la evolución de los parámetros mecánicos (módulo de elasticidad (ME), la tensión de fractura (TS) y la deformación hasta el punto de fractura (%E) en función del % de gelatina en la formulación, para los films con y sin lípido, a los 2 tiempos de almacenamiento. Estos parámetros son

habitualmente utilizados para describir el comportamiento mecánico de los films (Mc Hugh y Krochta, 1994) y están relacionados con su microestructura.

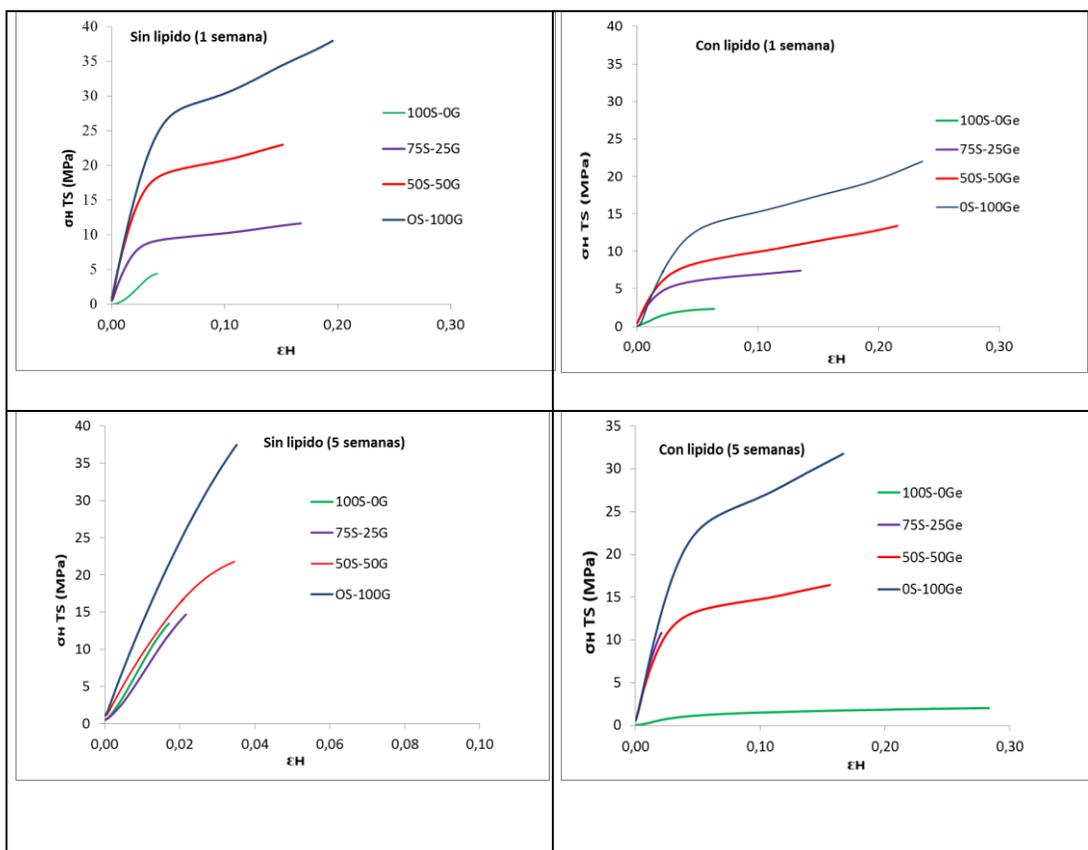


FIGURA IV.1.3. Esfuerzo de tensión (TS) vs deformación de Henky (ϵ_H), de films de almidón de yuca y gelatina, puros y mixtos, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas). Films acondicionados a 25°C y 53% de HR.

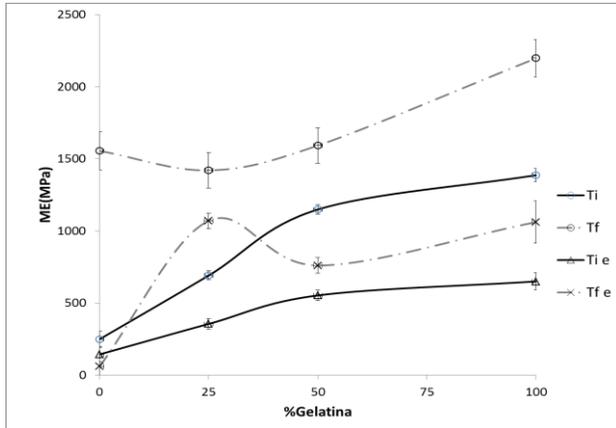


FIGURA IV.1.4 Modulo de elasticidad (ME) en función del porcentaje de gelatina incorporado a los films de almidón de yuca, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C y 53% de HR.

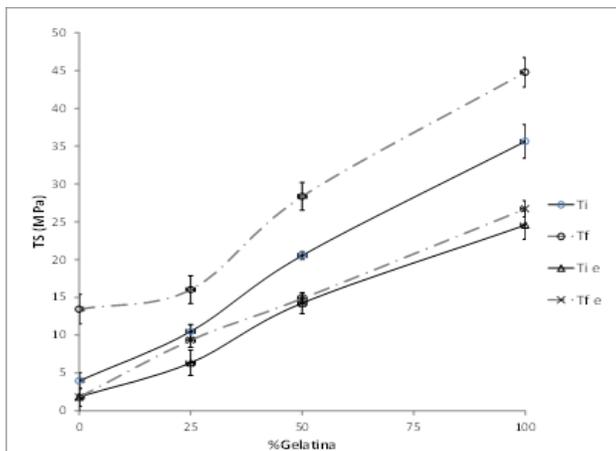


FIGURA IV.1.5 Tensión de fractura (TS) en función del porcentaje de gelatina incorporado a los films de almidón de yuca, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C y 53% de HR.

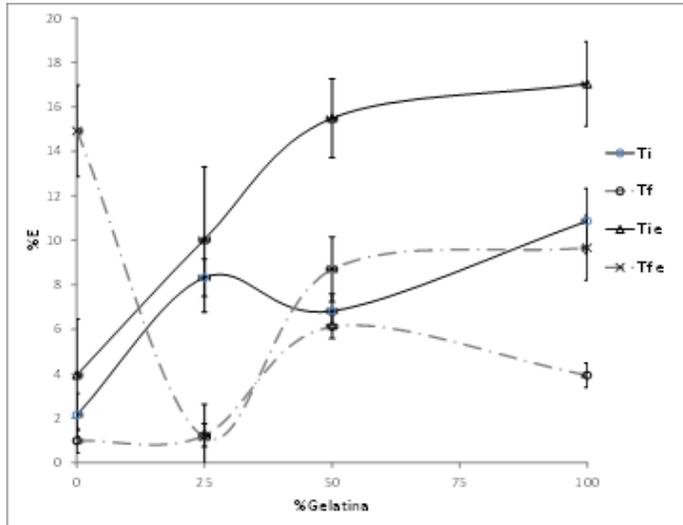


FIGURA IV.1.5 Porcentaje de extensibilidad (E) en función del porcentaje de gelatina incorporado a los films de almidón de yuca, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C y 53% de HR.

Tabla IV.1.3 Modulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TS) y deformación hasta el punto de fractura (E) de films de almidón de yuca y gelatina, puros y mixtos, con y sin adición de lípido E471, a dos tiempos de almacenamiento (1 y 5 semanas) a 25°C a HR 53%. Valores medios (desviación estándar) y resultados del ANOVA.

FILMS	ME (MPa)		TS (MPa)		E (%)	
	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas
100S-0G	131(31) ^{(ef)(x)(1)}	770(171) ^{(b)(x)(2)}	4,1(0,7) ^{(fg)(x)(1)}	13(2) ^{(c)(x)(2)}	4,5(0,9) ^{(e)(x)(1)}	1,9(0,6) ^{(e)(x)(2)}
100S-0Ge	73(17) ^{(f)(x)(1)}	26(7) ^{(e)(y)(2)}	2,2(0,5) ^{(g)(y)(1)}	1,9(0,3) ^{(e)(y)(1)}	6(2) ^{(de)(x)(1)}	28(5) ^{(a)(y)(2)}
75S-25G	354(51) ^{(c)(x)(1)}	724(57) ^{(b)(x)(2)}	11,2(1,4) ^{(e)(x)(1)}	16(3) ^{(c)(x)(2)}	15(1) ^{(bc)(x)(1)}	2,4(0,5) ^{(e)(x)(2)}
75S-25Ge	191(22) ^{(e)(y)(1)}	544(68) ^{(c)(y)(2)}	7(1) ^{(f)(y)(1)}	10(3) ^{(d)(y)(2)}	17(3) ^{(b)(x)(1)}	2,2(0,8) ^{(e)(x)(2)}
50S-50G	627(54) ^{(b)(x)(1)}	812(119) ^{(b)(x)(2)}	24(2) ^{(c)(x)(1)}	30(3) ^{(b)(x)(2)}	14(4) ^{(cd)(x)(1)}	12(3) ^{(c)(x)(2)}
50S-50Ge	271(46) ^{(d)(y)(1)}	392(58) ^{(d)(y)(2)}	16(2) ^{(d)(y)(1)}	16(2) ^{(c)(y)(2)}	30(4) ^{(b)(y)(1)}	18(7) ^{(b)(x)(2)}
0S-100G	703(23) ^{(a)(x)(1)}	1119(87) ^{(a)(x)(2)}	37(2) ^{(a)(x)(1)}	46(5) ^{(a)(x)(2)}	19(2) ^{(b)(x)(1)}	8(2) ^{(d)(x)(2)}
0S-100Ge	336(28) ^{(cd)(y)(1)}	599 (35) ^{(c)(y)(2)}	28(5) ^{(b)(y)(1)}	31(3) ^{(b)(y)(1)}	31(5) ^{(a)(y)(1)}	17(4) ^{(b)(y)(2)}

a, b, c, d, e, f, g, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. (p < 0.05).

x, y, Diferentes superíndices dentro de una misma formulación indican diferencias significativas con y sin adición de lípido E471. (p<0.05)

1, 2, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. (p < 0.05).

La Tabla IV.1.3 muestra los valores de estos parámetros mecánicos para cada una de las formulaciones, a los diferentes tiempos de almacenamiento a 25°C y HR 53%.

En general, el módulo de elasticidad y la resistencia a la fractura aumentaron con el aumento en la proporción de gelatina, mientras que la incorporación de lípido provocó una disminución de estos valores. Con el tiempo de almacenamiento, aumentó la rigidez de los films (mayor módulo de elasticidad), salvo en los films de almidón puro con lípido. La resistencia a la fractura también aumentó en todos los films sin lípido, aunque con lípido este efecto no fue notable. Respecto a la extensibilidad, aumentó con la adición de gelatina en 25 %, pero no cambió significativamente en proporciones mayores en los films con 1 semana. No obstante, el film con 50 % de gelatina ganó extensibilidad durante el almacenamiento más prolongado, al igual que el de gelatina pura. La incorporación de lípido aumentó la extensibilidad de los films en todos los casos para los films de 1 semana y 5 semanas, excepto para la formulación con 25 % de gelatina donde no influyó en la extensibilidad a ninguno de los tiempos analizados. Los films de almidón con lípido experimentaron un notable aumento de extensibilidad durante el almacenamiento prolongado.

Los resultados obtenidos para las propiedades mecánicas de los films puros (almidón y gelatina) fueron similares a los obtenidos por otros autores (Chambi y Grosó, 2006; Hassan y Norziah, 2012).

Comparando dichos valores, se observa que los films de gelatina fueron más resistentes, más extensibles y más rígidos que los de almidón de yuca. En ese sentido, la incorporación de gelatina a la matriz de almidón aumentó la resistencia, extensibilidad y rigidez en los films mixtos. Por el contrario, Hassan y Norziah. (2012) obtuvieron films menos resistentes, más deformables y menos rígidos al incorporar gelatina de pescado a films de almidón de sagú, con glicerol como plastificante. Sin embargo, en estudios previos, Pranoto et al. (2007) señalaron que los polisacáridos macromoleculares de cadenas largas, como el almidón, pueden entrelazarse con la gelatina, aumentando la resistencia mecánica. Además, los polisacáridos pueden formar redes con las moléculas de gelatina al interaccionar los grupos aniónicos de los polisacáridos y los catiónicos de la gelatina, fortaleciendo la estructura final (Linus et al., 2003). En las formulaciones mixtas las cadenas de polisacáridos y proteínas se mezclan a través grupos hidroxilo que forman enlaces de hidrógeno entre la gelatina-almidón-glicerol-agua (Hassan y Norziah, 2012).

La disminución de la resistencia y rigidez de los films por la adición del lípido, tanto en el tiempo inicial como en el tiempo final de almacenamiento, ha sido también observada en estudios similares, al incorporar diferentes ácidos grasos en films de almidón de maíz (Jiménez et al., 2012) y ácido esteárico a films de almidón (Reolón et al., 2013). En ambos trabajos se utilizó también glicerol como

plastificante. En este sentido, Su et al. (2010) apuntan que el glicerol es una molécula de pequeño tamaño que puede penetrar entre las cadenas de los polímeros, y debilitar la interacción entre polisacáridos y proteínas. Por otra parte, las bajas fuerzas de cohesión que se establecen entre lípido-polímero, y la introducción de discontinuidades en la matriz del film, da lugar a una menor resistencia mecánica y rigidez.

En cuanto al aumento de la extensibilidad (%E) con la adición de lípido no ha sido previamente observada en films de almidón y además este fue mayor a medida que aumentó la proporción de gelatina, lo que parece indicar que en estos films las interacciones lípido-gelatina potencian el efecto plastificante del lípido. Es destacable el gran aumento en la extensibilidad con el tiempo de los films sin gelatina, lo cual sólo puede entenderse desde un cambio estructural en la matriz de almidón que libere las moléculas de lípido atrapado inicialmente en complejos con la amilosa. Esto podría debilitar las fuerzas intercadena, favoreciendo el deslizamiento de las moléculas de amilosa durante la extensión del film.

El aumento con el tiempo de almacenamiento de la resistencia y rigidez de los films, y la general disminución de su extensibilidad (excepto en el almidón puro) puede relacionarse con los fenómenos mencionados de progresiva agregación de las cadenas con el tiempo, así como con el crecimiento de las zonas cristalinas, tanto del almidón como de la gelatina. También se ha encontrado un

aumento en la rigidez y disminución de la extensibilidad con el tiempo en films de almidón de maíz con y sin ácidos grasos (Jiménez et al., 2012a) y en films de caseinato: almidón (Jiménez et al., 2012b). No obstante, en estos trabajos siempre se encontró una disminución de la resistencia a la fractura.

Los films de almidón puro con lípido tiene una evolución con el tiempo diferente al resto: disminuye la resistencia y aumenta la extensibilidad, con pocos cambios en la rigidez, lo que está relacionado con las interacciones del lípido en la matriz de almidón, y su evolución con el tiempo. En estudios previos con almidón de maíz y ácidos grasos, se observa un descenso en la extensibilidad con el tiempo, asociado a una mayor proporción de zonas cristalinas de los complejos amilosa-lípido (Jiménez et al., 2012). El comportamiento observado en almidón de yuca, tal como se ha comentado, podría deberse a la liberación del lípido de estos complejos con el tiempo, permitiendo a las moléculas de amilosa lineales deslizarse unas respecto a otras durante la extensión del film.

Chang et al. 2006 analizaron además el efecto del agua y el glicerol en las propiedades mecánicas de films de almidón de yuca. Los resultados mostraron que el glicerol actúa como antiplastificante cuando está presente en bajas concentraciones (2,5%) en films secos (a_w 0,22). Por el contrario, cuando existe suficiente cantidad de agua, el glicerol tiene el típico comportamiento de plastificante.

Esto se reflejó en las propiedades mecánicas determinadas a altos niveles de deformación como TS y %E.

Los resultados obtenidos revelan que la adición de lípidos afecta a la estructura de los films según el tipo de lípido y los cambios en sus interacciones con la matriz con tiempo. Estos cambios están relacionados con fenómenos de cristalización que tiene lugar en los diferentes componentes. Jiménez et al. (2012) señalan que los films recién preparados presentan una fracción cristalina pequeña debido a que durante la preparación de las emulsiones formadoras de film, la gelatinización del almidón hace que el almidón nativo pierda la cristalinidad. Sin embargo, durante el periodo de secado ocurre la re-cristalización de la amilosa y del lípido. En el almidón de yuca existe además, una fracción importante de amilopectina, que es la principal responsable de la re-cristalización en períodos de almacenamiento prolongados, si en el sistema se da suficiente movilidad molecular. La amilosa cristaliza muy rápido, durante el secado y acondicionado de los films.

Las variables de composición consideradas y el tiempo de almacenamiento influyeron de forma decisiva en las propiedades mecánicas de los films de almidón. Se mejoró la dureza, la resistencia a la fractura y la extensibilidad con la incorporación de gelatina. El lípido provocó una disminución de la dureza y resistencia mecánica, pero potenció la extensibilidad cuando el contenido en gelatina fue del 50%. Con el tiempo de almacenamiento aumentó la

dureza y resistencia de la fractura de los films, especialmente en los que no contienen lípido. No obstante la presencia de lípido potenció la extensibilidad de los films durante el almacenamiento, especialmente en los films con solo almidón. El film mixto 50% almidón y 50% gelatina sin lípido fue la formulación con mejores propiedades mecánicas.

IV. CAPITULO 2
PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE FILMS
DE ALMIDÓN DE YUCA-GELATINA

IV.2.1. OBSERVACIONES MICROESTRUCTURALES

En esta parte del trabajo, se analizó la estructura interna y superficial de los films por diferentes técnicas: difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia de fuerza atómica (AFM), tal y como se comentan a continuación.

Difracción de rayos X.

En el caso del almidón puro, los espectros obtenidos muestran carácter amorfo sin picos que revelen la formación de zonas cristalinas predominantes. Los picos típicos observados para las distintas formas cristalinas del almidón (tipo A, B y la mezcla de ambos, tipo C), aparecen a 2θ 15° , 18° y 23° (Zeng et al., 2011). Estos picos no se observan en las muestras analizadas con almidón de yuca, seguramente debido a la baja proporción de amilosa en este almidón. El almidón de yuca utilizado como materia prima, contiene un 9,28% de amilosa (g/100 g) y una proporción de amilosa/amilopectina de 1:9,78, obtenida tal y como se ha descrito en el apartado III.1.1. Esta proporción de amilosa/amilopectina fue menor que la obtenido en estudios previos por Souza et al., (2012), entre 19,7-22,5%, lo que puede ser debido a los diferentes cultivos utilizados. No se detectó un aumento de la cristalinidad con el tiempo

de almacenamiento. Estudios previos (Stading et al., 2001) han demostrado que la cristalización de los polímeros de almidón durante la formación de films ocurre básicamente durante el periodo de secado cuando hay una alta movilidad de las cadenas de amilosa. Por tanto, el tiempo de secado influye en gran medida en el nivel de cristalización del film. En esta etapa ocurre la cristalización de la amilosa y en gran extensión, la de la amilopectina que cristaliza a tiempos muy largos, si la matriz tiene movilidad molecular (estado gomoso). A la humedad relativa de acondicionamiento de las muestras, la movilidad molecular parece impedida ya que no se observa aparición de fases cristalinas en los films almacenados durante 5 semanas.

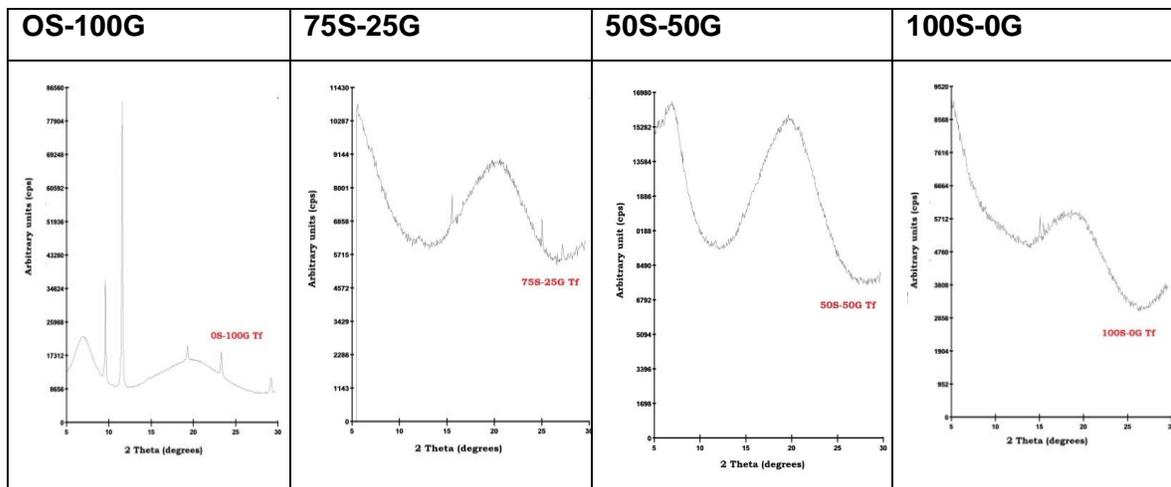
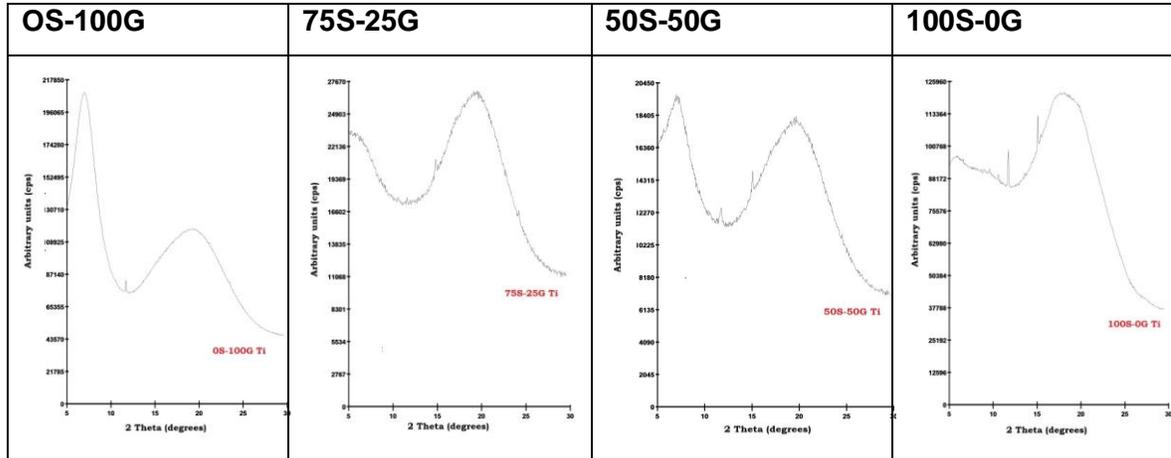


Figura VI.2.1. Difractogramas por Rayos X de films de almidón de yuca y gelatina, sin lípido E471, a dos tiempos 1 y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

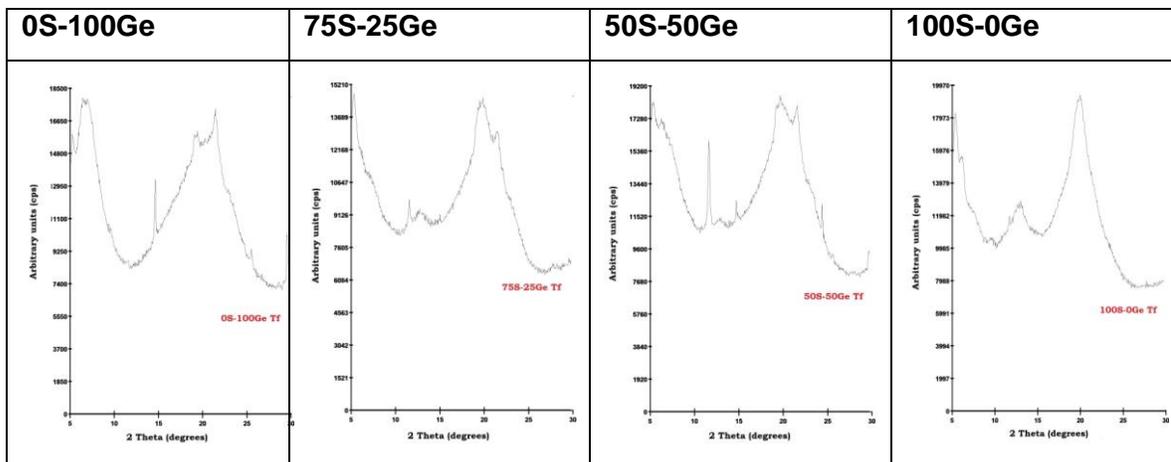
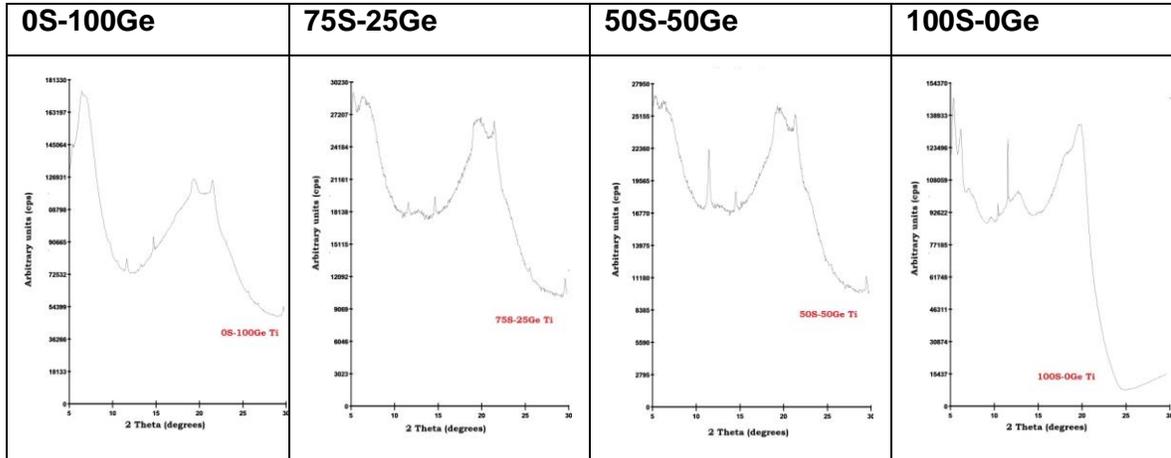


Figura VI.2.1. Difractogramas por Rayos X de films de almidón de yuca y gelatina, con y sin lípido E471, a dos tiempos 1 y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

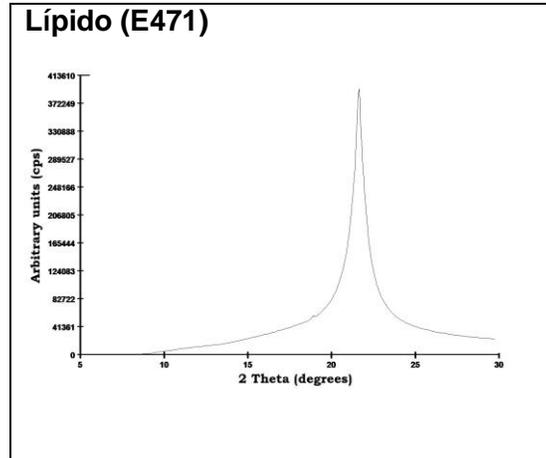


Figura IV.2.2. Difractograma obtenido por rayos X del lípido puro.

La adición del lípido (E471), a la matriz de almidón, aumentó la cristalinidad (se detectan mayor número de picos). Esto es debido por una parte a la cristalización del lípido puro, que se refleja de forma clara en el pico que aparece entorno a 20° (Figura IV.2.2) y debido a la posible formación de complejos lípido-amilosa tipo V en torno a $2\Theta = 7,3^\circ$ (Bhatnagar y Hanna, 1994). El tiempo tampoco afectó a la cristalinidad de la matriz con lípidos.

La gelatina bovina pura presentó un espectro de rayos X característico de un material parcialmente cristalino con un pico ancho de baja intensidad a 2Θ $20-22,5^\circ$, tal y como han observado otros autores (Bergo y Sobral, 2007; Rivero et al., 2010; Andreuccetti et al., 2011). Además aparece otro pico de mayor intensidad a 2Θ $7-8^\circ$, relacionado con la formación de la estructura de triple hélice en la molécula de gelatina (Bigi et al., 2004; Yakimets et al., 2005, 2007).

Al final del almacenamiento, aparecen picos intensos y definidos, indicando una mayor proporción de zonas cristalinas, seguramente relacionado con una mayor ordenación de las estructuras dentro de la matriz.

Al añadir el lípido al film de gelatina, se superponen los picos de cristalización del polímero y del lípido, éste último en torno a 20-23°. El almacenamiento no dio lugar a cambios notables en el espectro de rayos X obtenido. Esto parece indicar que en las muestras con lípido, parece que haya cierta inhibición parcial de los fenómenos de cristalización con el tiempo de almacenamiento debido a la posible formación de complejos gelatina-lípido, tal y como ha sido observado por otros autores (Andreuceti et al. 2011), al trabajar con films de gelatina formulados con diferentes surfactantes, independientemente de su concentración y de naturaleza.

Los films mixtos generaron espectros que “suman” las formas características vistas para los respectivos compuestos puros; los picos están en las mismas zonas pero cambian las intensidades dependiendo de la proporción almidón:gelatina. En estos films apenas cambia las formas de los espectros con el tiempo. Esto parece indicar que la incorporación de gelatina en la mezcla queda inhibido el crecimiento de zonas semi-cristalinas con el almacenamiento. Por otro lado, la incorporación del lípido aumentó la cristalinidad, como se observó en la matriz pura de almidón.

En conclusión no se observó cristalización para los polímeros, aunque la gelatina formó asociaciones semicristalinas de las formas helicoidales que progresaron durante el almacenamiento de los films. El lípido cristalizó, al menos parcialmente, en todas las formulaciones. En los films mixtos se inhibió el crecimiento de las zonas cristalinas de la gelatina.

Microscopia electrónica de barrido

Se analizó la estructura interna y superficial de los films por diferentes técnica: microscopia electrónica de barrido (SEM) y microcopia de fuerza atómica (AFM).

Las figuras IV.2.3 y IV.2.4 presentan las secciones transversales de las formulaciones de los diferentes films sin y con lípido, respectivamente. En los cortes transversales, las micrografías muestran que el film de almidón puro (100S-0G) presento una alta homogeneidad con una apariencia lisa y compacta, tal y como han observado otros autores (Jiménez et al. 2012). Se ven algunos microcanales en la parte superior, que pueden ser asociados a zonas preferentes de salida de agua durante secado. En el film de gelatina pura (0S-100G), las micrografías mostraron las zonas de alineamiento de las cadenas de este polímero a través de la conformación helicoidal descrita, con un aspecto también compacto y

ligeramente más rugoso debido a la coexistencia de zonas amorfas y cristalinas.

En los films mixtos (75S-25G / 50S-50G), se observa un alineamiento regular de las cadenas de los polímeros, atribuible a la gelatina, lo que lo parece indicar que no se da la compatibilidad total entre ambos polímeros, dando lugar a dos fases (una rica en gelatina y otra rica en almidón) que se interpenetran.

La incorporación del lípido da lugar a microestructuras diferentes, dependiendo de la composición polimérica. Con almidón se forma la matriz típica de los complejos almidón-lípido, con un aspecto irregular y frágil, pero no se observan partículas de lípido claramente separadas, lo que revela la integración de una gran parte de las moléculas lipídicas en las estructuras complejas. En el film de gelatina pura, tampoco se diferencian las partículas lipídicas, con una morfología estructural más próxima a los films de gelatina pura. Sin embargo, en los films mixtos, se aprecian claramente los glóbulos lipídicos dispersos en la matriz. Esto parece indicar que la mezcla almidón gelatina interacciona a nivel de cadenas, limitando la capacidad de incorporación del lípido en forma de complejos.

Por otro lado, las figuras IV.2.5 (sin lípido), muestran observaciones de la superficie de los mismos films. Las micrografías de almidón presentaron micro-roturas en su superficie, formadas durante la observación microscópica por la mayor fragilidad de los mismos, que van disminuyendo a medida que aumenta el contenido en gelatina.

Además, presentaron una estructura compacta muy homogénea, lo que indicaría que la gelatinización ha sido completa y no quedan gránulos. Los films de gelatina pura (0S-100G), muestran también estructuras muy homogéneas con superficies continuas muy lisas. En los films de gelatina se aprecian zonas redondeadas que podrían atribuirse a las zonas de organización semicristalina que emergen a la superficie del film. En los films mixtos (75S-25G / 50S-50G) se puede observar que, a mayor cantidad de gelatina en la formulación más irregular es la superficie del film. Esto se explica por la formación de dos fases, tal como se ha comentado previamente, aunque ambos compuestos parecen tener cierta compatibilidad.

La adición del lípido (Figura IV.2.6) introduce discontinuidades en la superficie, indicando que parte del lípido no queda atrapado/integrado en la matriz debido a la falta de miscibilidad con los componentes, lo que provoca fenómenos de coalescencia y cremado durante el proceso de secado (Monedero et al., 2009; Sánchez-González et al., 2010). Este efecto es más marcado en los films con mayor proporción de gelatina, lo que indica una menor integración del lípido en la matriz continua como consecuencia de las interacciones de gelatina-almidón.

La observación microscópica de los films en el almacenamiento no reflejó cambios cualitativos en la estructura de los films.

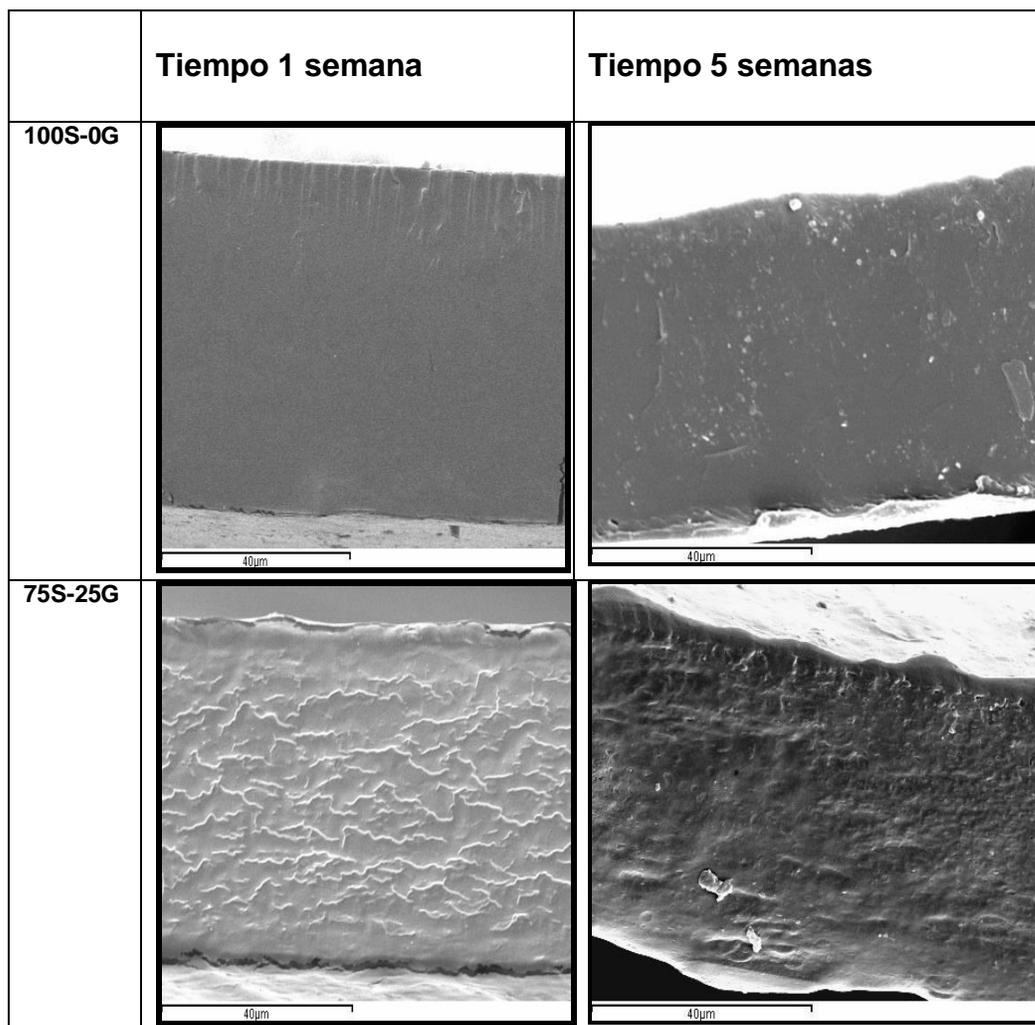


Figura IV.2.3. Micrografías de las secciones transversales obtenidas por SEM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (1500 aumentos) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

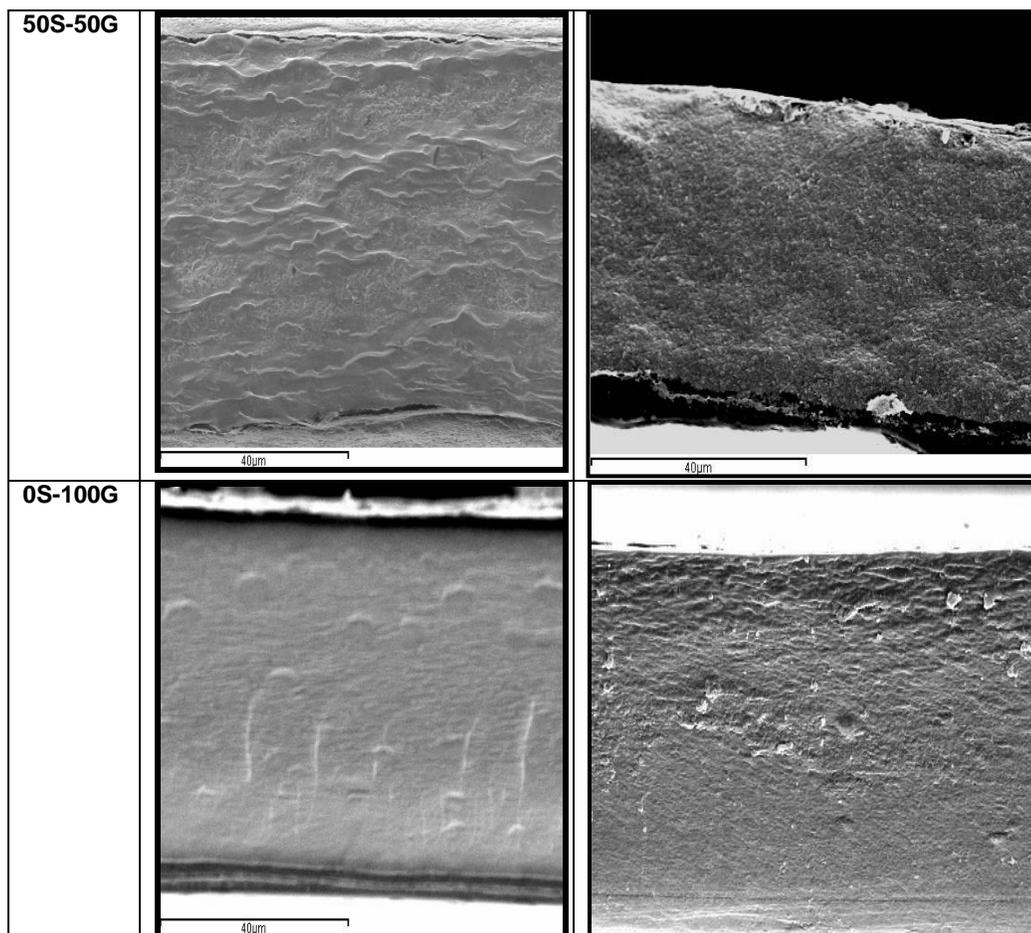


Figura IV.2.3. Micrografías de las secciones transversales obtenidas por SEM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (1500 aumentos) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

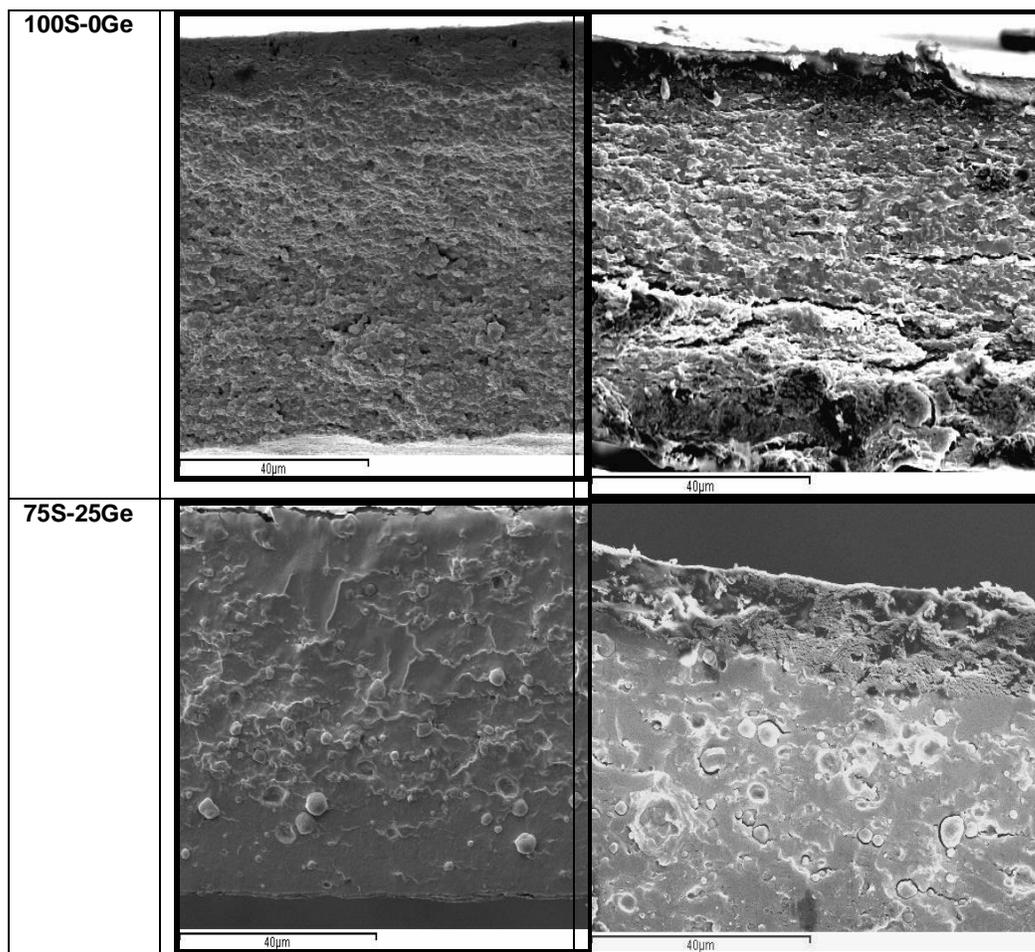


Figura IV.2.4. Micrografías de las secciones transversales obtenidas por SEM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (1500 aumentos) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

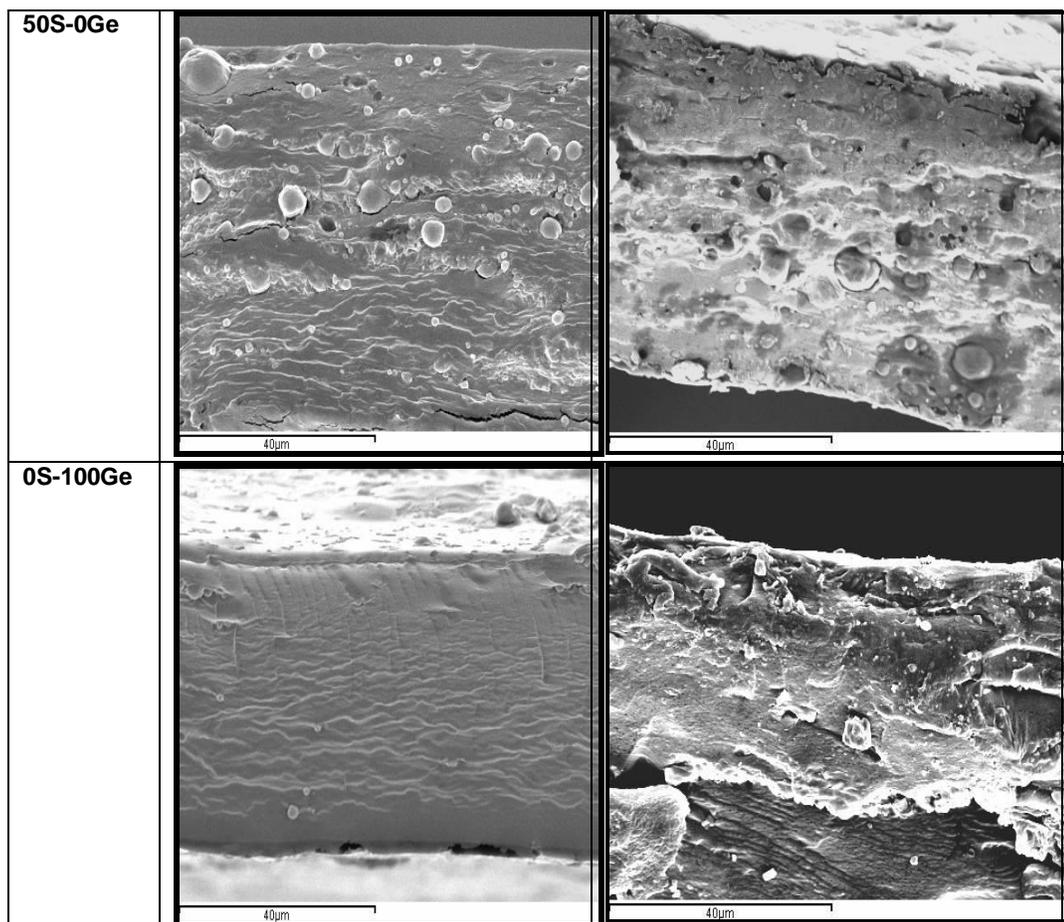


Figura IV.2.4. Micrografías de las secciones transversales obtenidas por SEM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (1500 aumentos) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

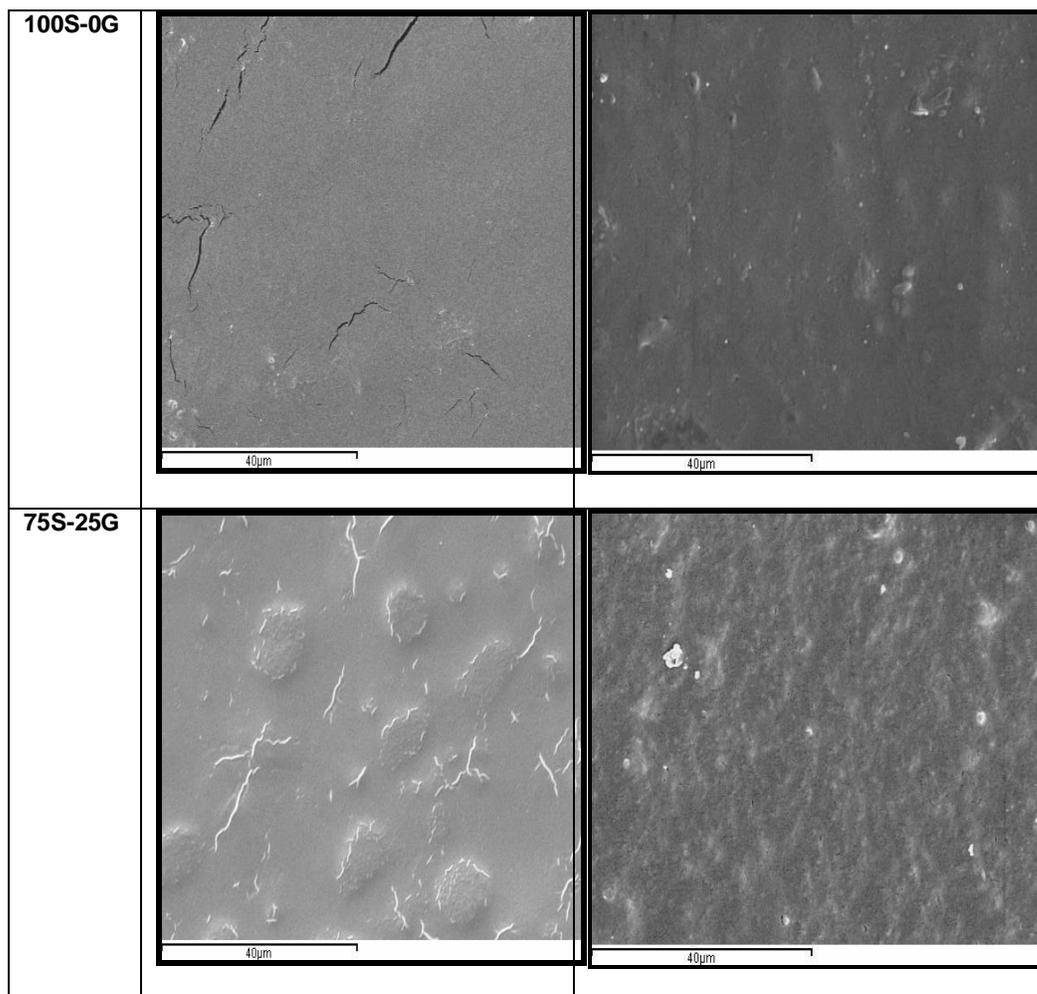


Figura IV.2.5. Micrografías de la superficie de los films de almidón de yuca y gelatina bovina obtenidas por SEM (1500 aumentos) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

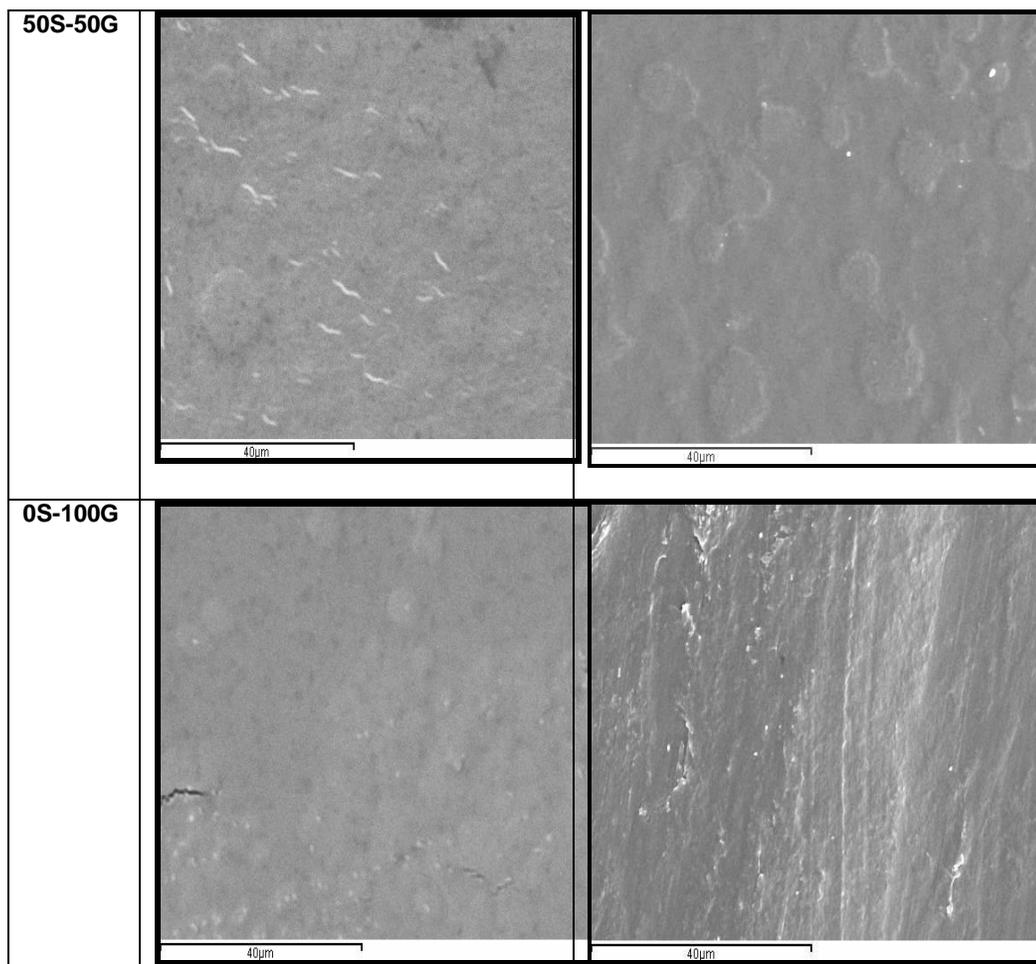


Figura IV.2.5. Micrografías de la superficie de los films de almidón de yuca y gelatina bovina obtenidas por SEM (1500 aumentos) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

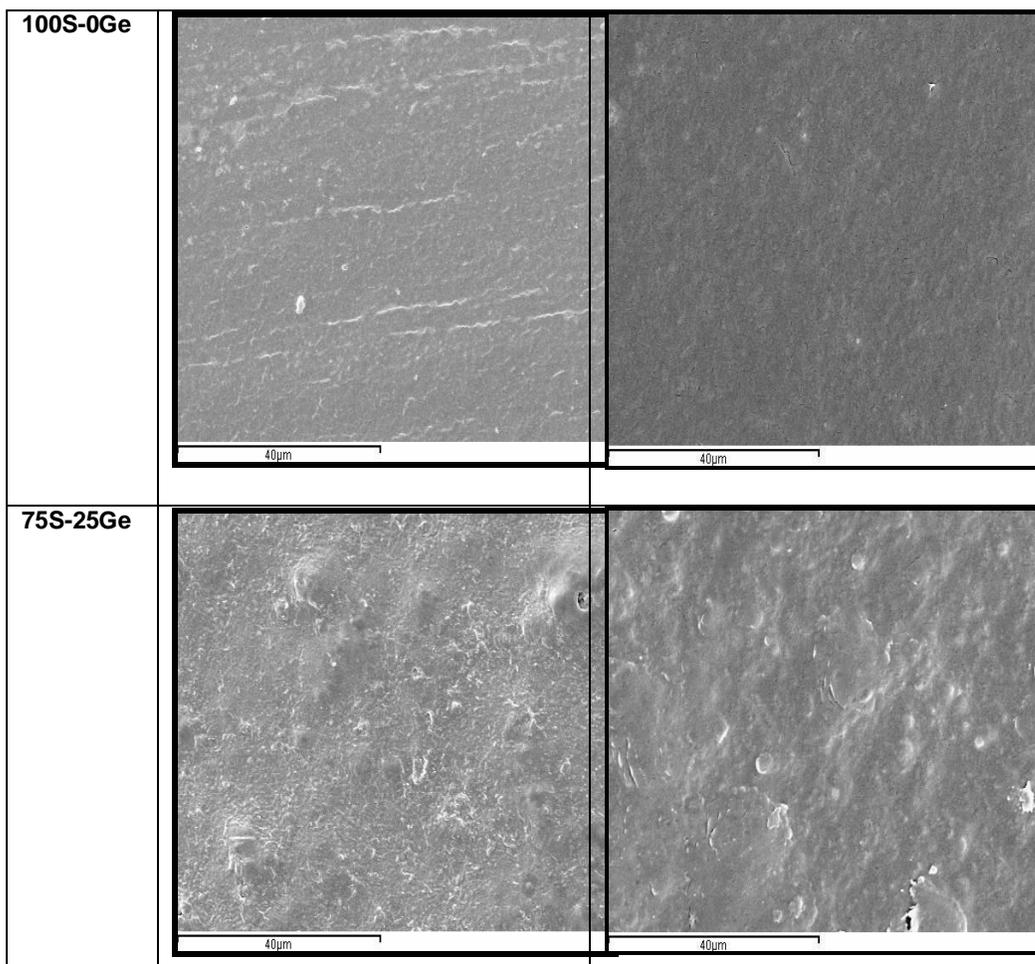


Figura IV.2.6. Micrografías de la superficie de los films de almidón de yuca y gelatina bovina obtenidas por SEM (1500 aumentos) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

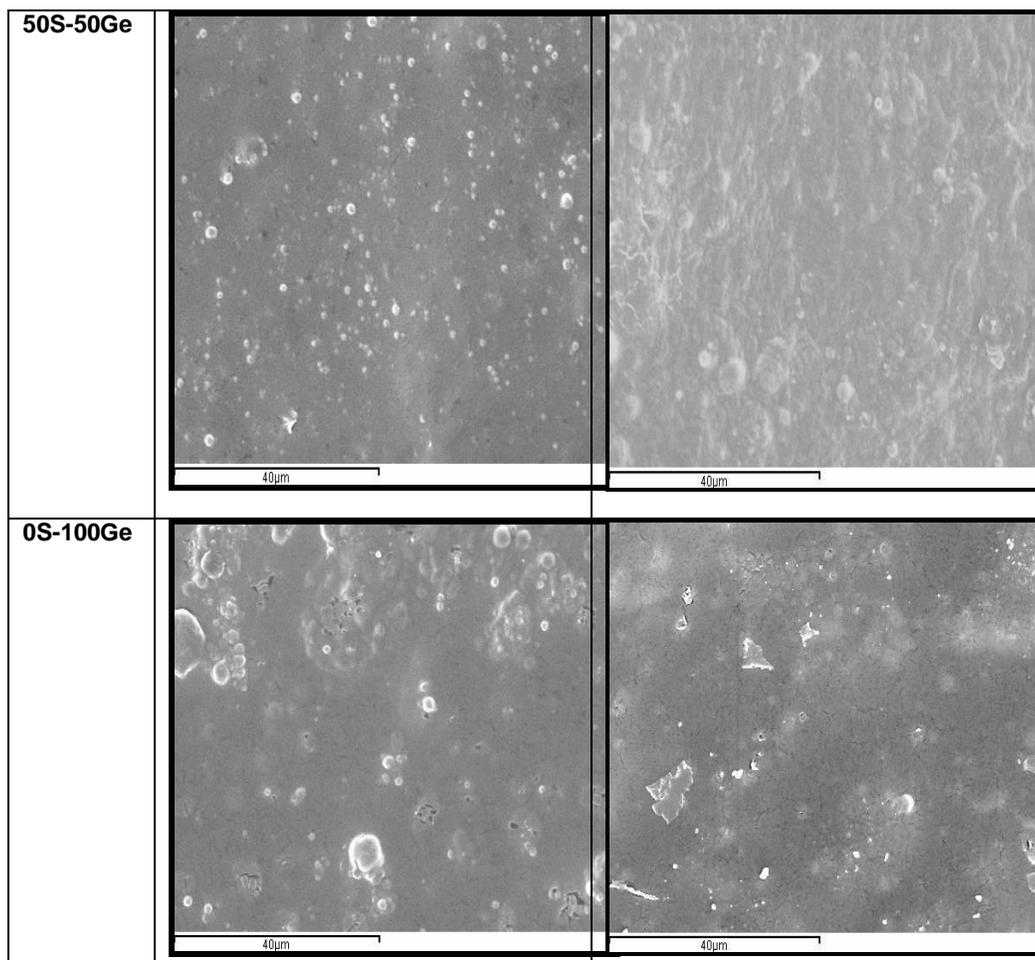


Figura IV.2.6. Micrografías de la superficie de los films de almidón de yuca y gelatina bovina obtenidas por SEM (1500 aumentos) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La Figura IV.2.7 y IV.2.8 muestra las micrografías obtenidas por AFM en modo *tapping* para todos los films y tiempos de almacenamiento. Esta técnica proporciona información sobre la topografía de las superficies analizadas. En la Tabla IV.2.1 se muestran los parámetros de rugosidad dados por el equipo tras el análisis (R_a , R_q).

En coherencia con los valores de rugosidad determinados, en la Figura IV.2.7 se observa que los films de gelatina presentan una superficie más lisa que los puros de almidón o las mezclas, aunque en la observación de la superficie de los films por SEM no fue tan evidente. Con el tiempo de almacenamiento sí que parece aumentar la rugosidad de todos los films, en coherencia con parámetros de rugosidad.

La incorporación del lípido (Figura IV.2.8) aumentó la rugosidad superficial de los films de gelatina y la disminuyó en la de los de almidón puro, según se observó también en las observaciones por SEM. Esto parece indicar que la cantidad de lípido cremado durante el secado de los films fue mayor para la dispersión de gelatina y que para la de almidón y esta presentó una mayor estabilidad, probablemente por la formación de complejos más estables.

TABLA IV.2.1. Parametros de rugosidad Rq (Rugosidad media cuadrática), Ra (Rugosidad promedio) de los films de almidón de yuca y gelatina bovina (sin y con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento medidos por AFM)

	Rq	Rq	Ra	Ra
FILMS	1 semana	5 semanas	1 semana	5 semanas
100S-0G	308(36) ^{(ab)(x)(1)}	582(127) ^{(d)(x)(2)}	241(26) ^{(abc)(x)(1)}	481(108) ^{(d)(x)(2)}
100S-0Ge	138(62) ^{(a)(y)(1)}	368,67(34,03) ^{(bc)(x)(2)}	113(54) ^{(a)(y)(1)}	290(23) ^{(bc)(x)(2)}
75S-25G	578(16) ^{(c)(x)(1)}	458,3(139,4) ^{(cd)(x)(1)}	443(18) ^{(d)(x)(1)}	358(105) ^{(cd)(x)(1)}
75S-25Ge	518(75) ^{(c)(x)(1)}	485(119) ^{(cd)(x)(1)}	411(53) ^{(bcd)(x)(1)}	376(87) ^{(cd)(x)(1)}
50S-50G	421(43) ^{(bc)(x)(1)}	210(38) ^{(ab)(x)(2)}	329(34) ^{(bcd)(x)(1)}	172(29) ^{(ab)(x)(2)}
50S-50Ge	567(28) ^{(c)(y)(1)}	317(165) ^{(bc)(x)(1)}	442(23) ^{(cd)(y)(1)}	256(130) ^{(bc)(x)(1)}
0S-100G	167(25) ^{(a)(x)(1)}	86,87(4,13) ^{(a)(x)(2)}	133(25) ^{(a)(x)(1)}	82(10) ^{(a)(x)(1)}
0S-100Ge	483(204) ^{(bc)(x)(1)}	466,3(41,5) ^{(cd)(y)(1)}	380(173) ^{(ab)(x)(1)}	359(14) ^{(bcd)(y)(1)}

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices entre una misma columna indican diferencias en la formulación sin y con Ester para cada tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

1, 2, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

El efecto más notable del tiempo de almacenamiento se puede observar en los films de almidón (con o sin lípido), en los que aumenta de forma notable la rugosidad. Eso puede atribuirse a la formación de cristales superficiales de amilopectina, en la zona superficial donde la humectación del film aumenta la movilidad molecular. En el resto de los films, no hubo cambios notables de rugosidad con el almacenamiento.

Al analizar las micrografías AFM obtenidas por el método de análisis de derivado del modo *tapping* (Figuras IV.2.7 y IV.2.8), de modo phase (Figuras IV.2.9 y IV.2.10) y en las segundas se obtiene con el modo *Peak force (Log DMT)*, las (Figuras IV.2.11 y IV.2.12), se pueden observar diferencias estructurales a nivel superficial de los films. Las primeras (modo *tapping* y modo phase) revelan los mapas superficiales de cambios en alguna propiedad del material (mecánica, eléctrica, etc.) y las segundas (modo *Peak force (Log DMT)*), muestran los mapas concretos del módulo de elasticidad en cada punto de la superficie. En los dos casos se aprecia heterogeneidad estructural en la superficie de los films, derivada de la presencia de zonas cristalinas o amorfas y/o lípido cremado.

Los mapas del módulo de elasticidad superficial (Figura IV.2.11) permiten diferenciar zonas más claras que se corresponden con partes más duras de la matriz y zonas más oscuras, con menor dureza. Estas imágenes dan una idea de la presencia de zonas cristalinas (más duras) y de las zonas preferentes de adsorción de

agua en regiones específicas de los fragmentos del polímero. Así, se puede resaltar la aparición de zonas claras en la matriz pura de gelatina y en los films mixtos, asociadas a las zonas de agregación de triples hélices del polímero. En el almidón también se observan formaciones de aspecto cristalino en la superficie del film. Aunque el análisis de rayos X no refleja una cristalización cuantitativa de los polímeros de almidón, en la superficie del film esta puede darse debido a la mayor movilidad molecular asociada con la humectación superficial

La incorporación del lípido (Figura IV.2.12) da lugar a zonas dispersas de color oscuro (con menor dureza), que quedan integradas en mayor o menor grado en la matriz continúa. Las imágenes de AFM no revelan una evolución clara con el tiempo de almacenamiento. La pequeña zona observada en cada caso (30x30 μm) y la gran heterogeneidad observada dificultan una interpretación clara de lo observado.

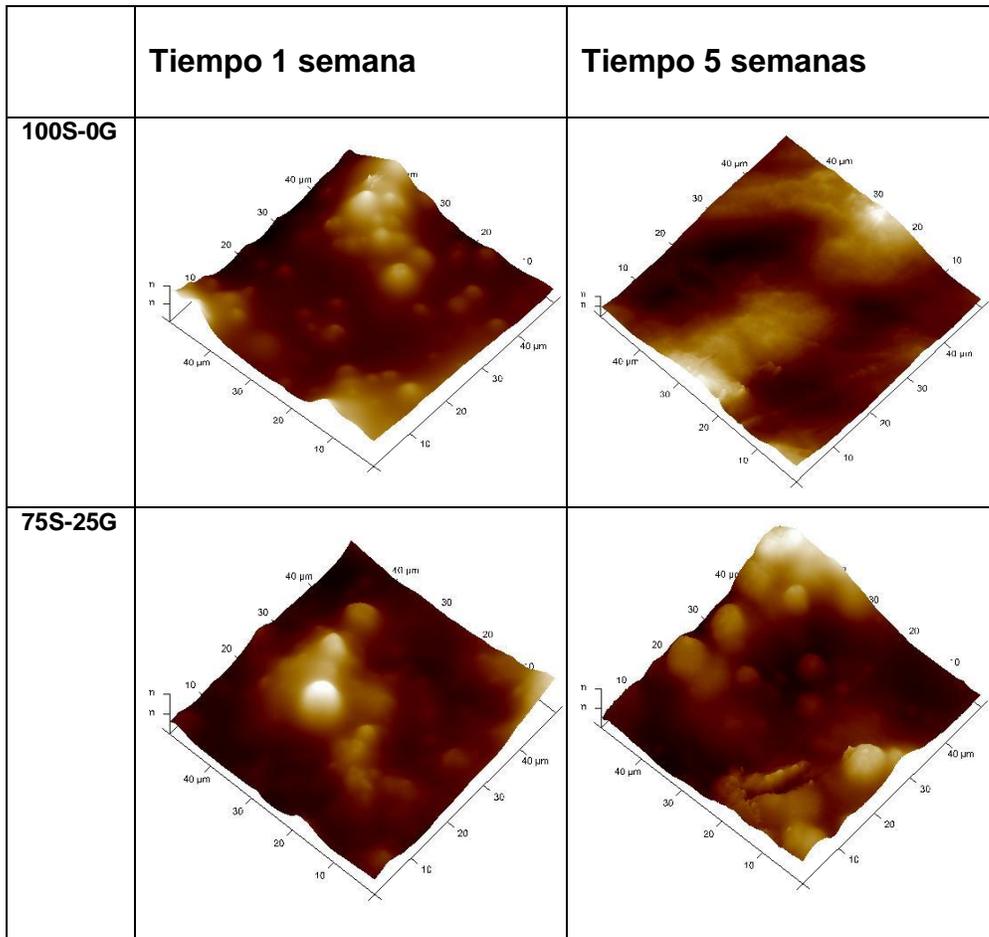


Figura IV.2.7 Micrografías obtenidas por AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (tapping mode, 50 x 50µm) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

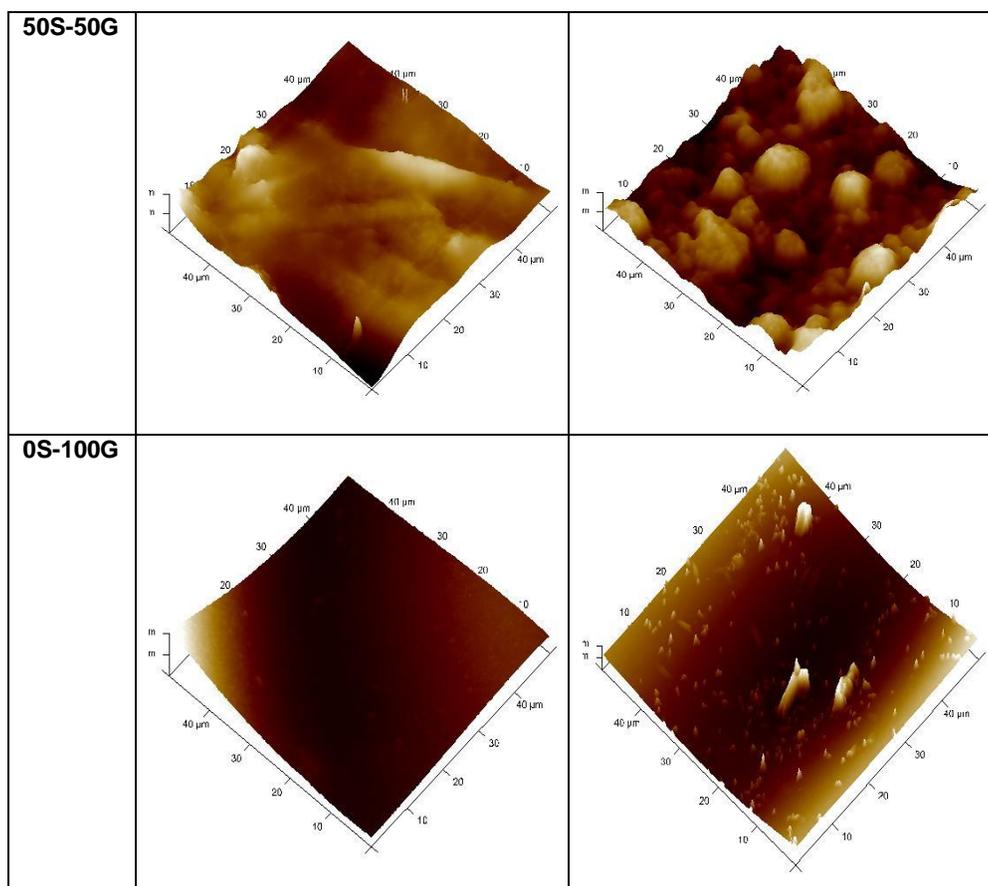


Figura IV.2.7 Micrografías obtenidas por AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (tapping mode, 50 x 50µm) sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

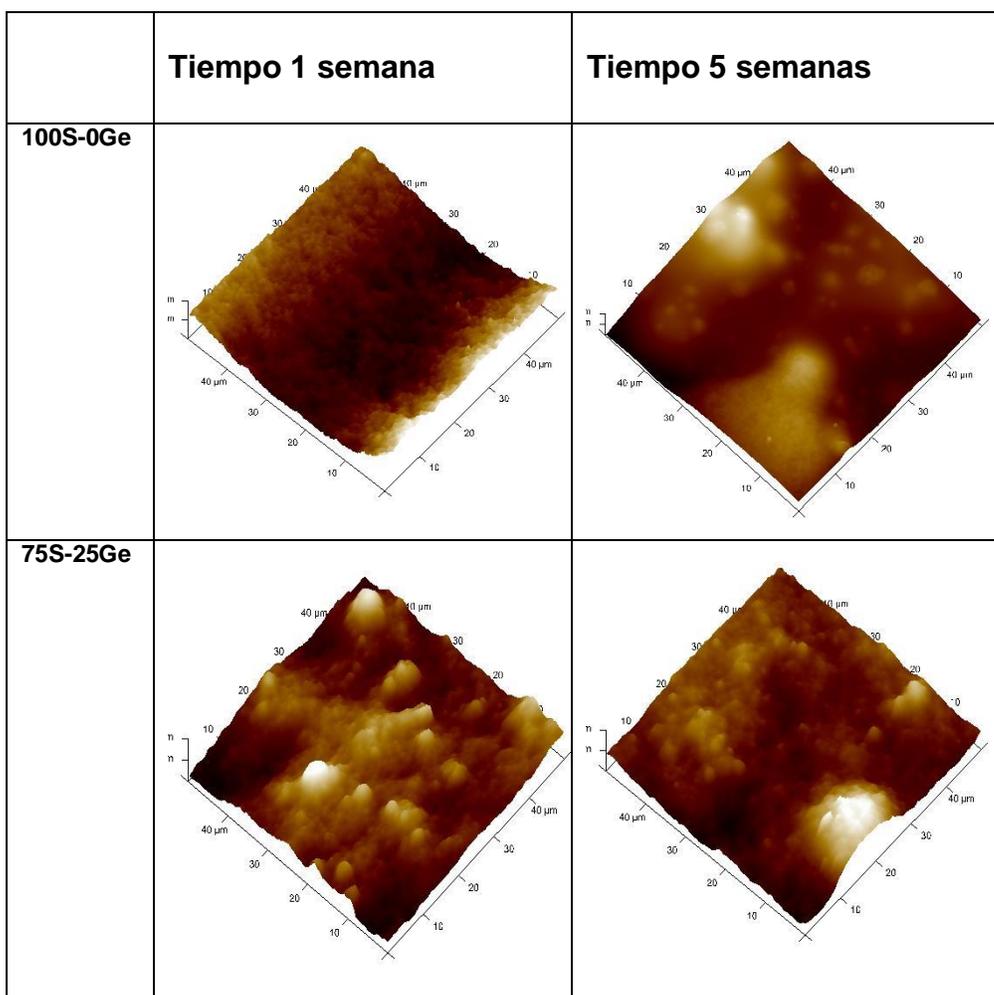


Figura IV.2.8. Micrografías obtenidas por AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (tapping mode, 50x 50 μ m) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

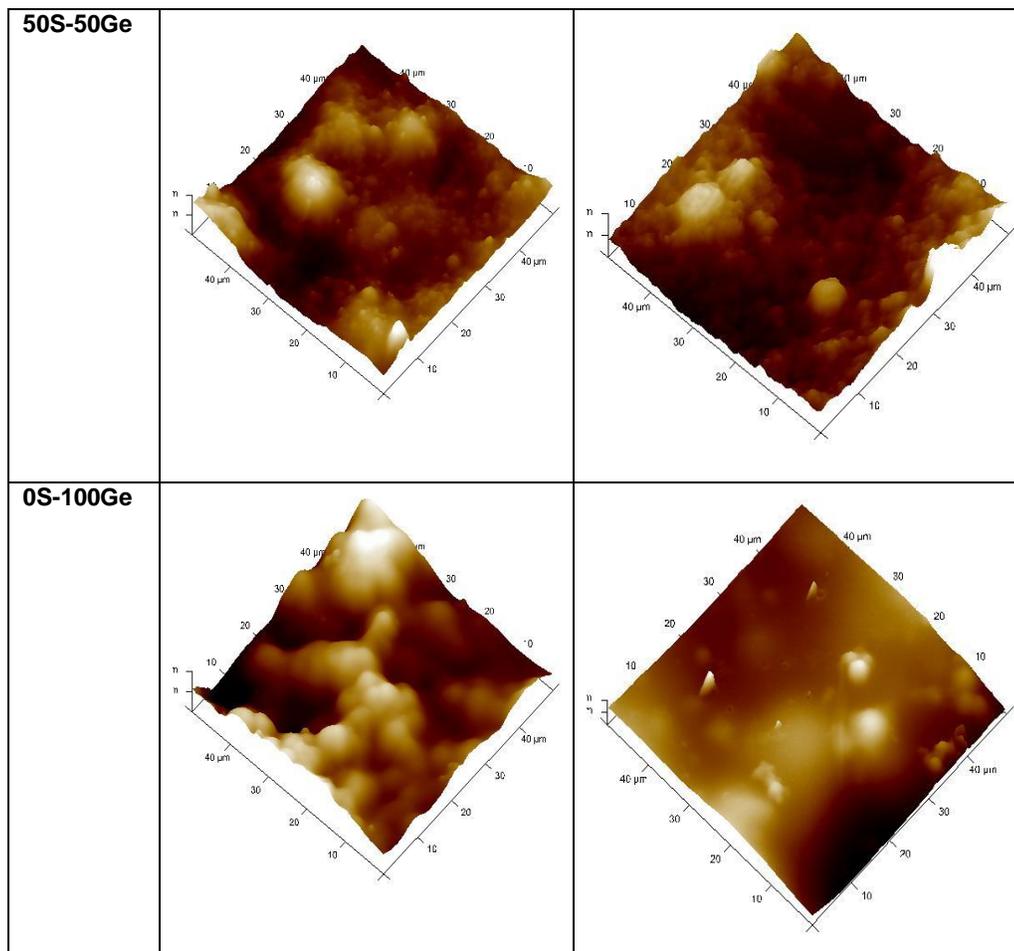


Figura IV.2.8. Micrografías obtenidas por AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (tapping mode, 50x 50 μ m) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

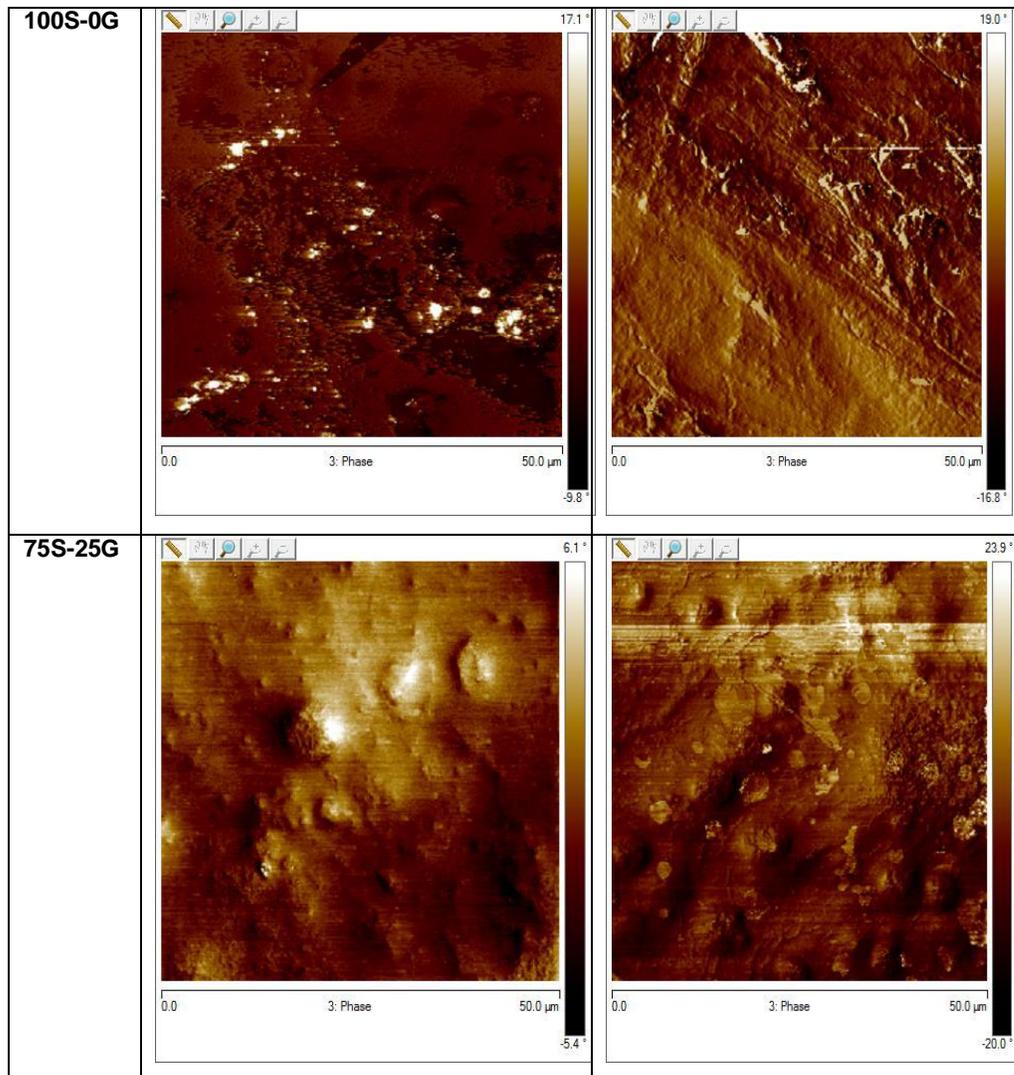


Figura IV.2.9. Micrografías obtenidas por AFM (mode PHASE 50 x 50µm) de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

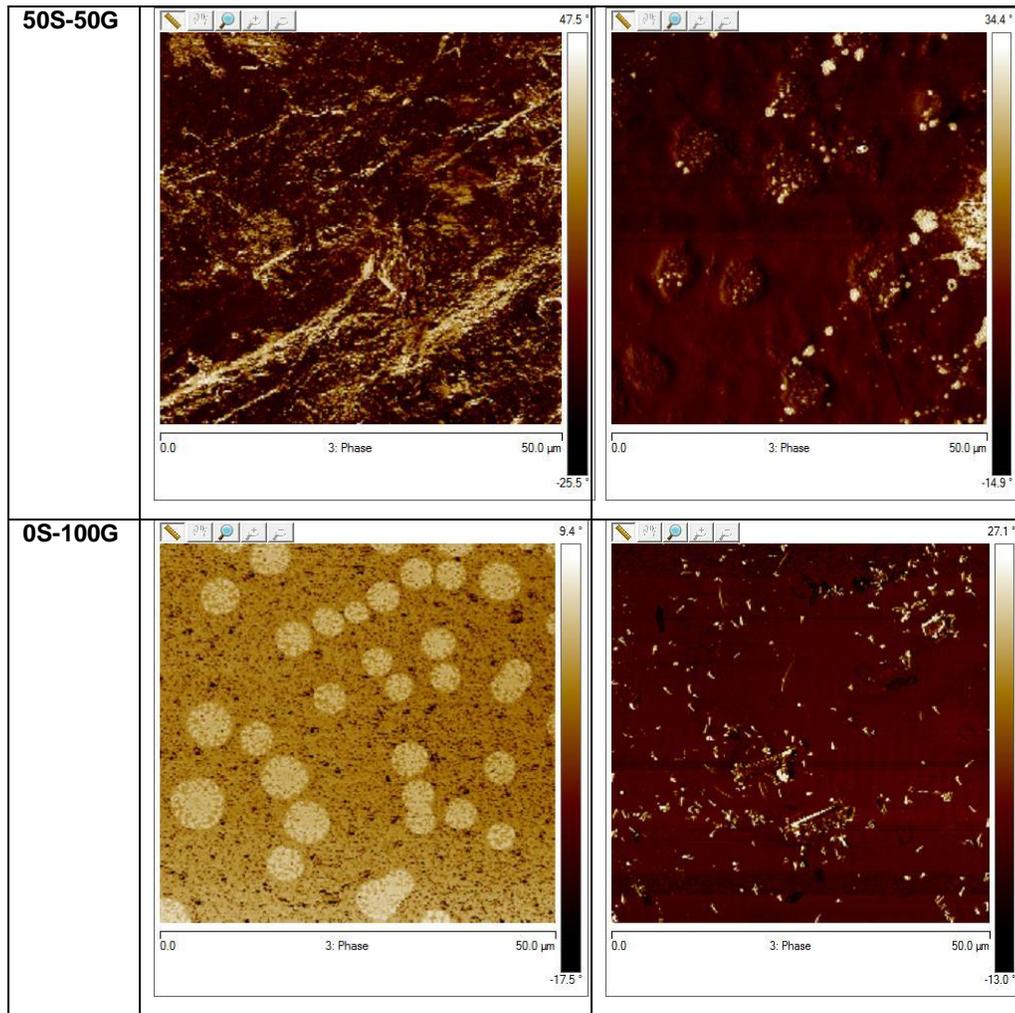


Figura IV.2.9. Micrografías obtenidas por AFM (mode PHASE 50 x 50 μ m) de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

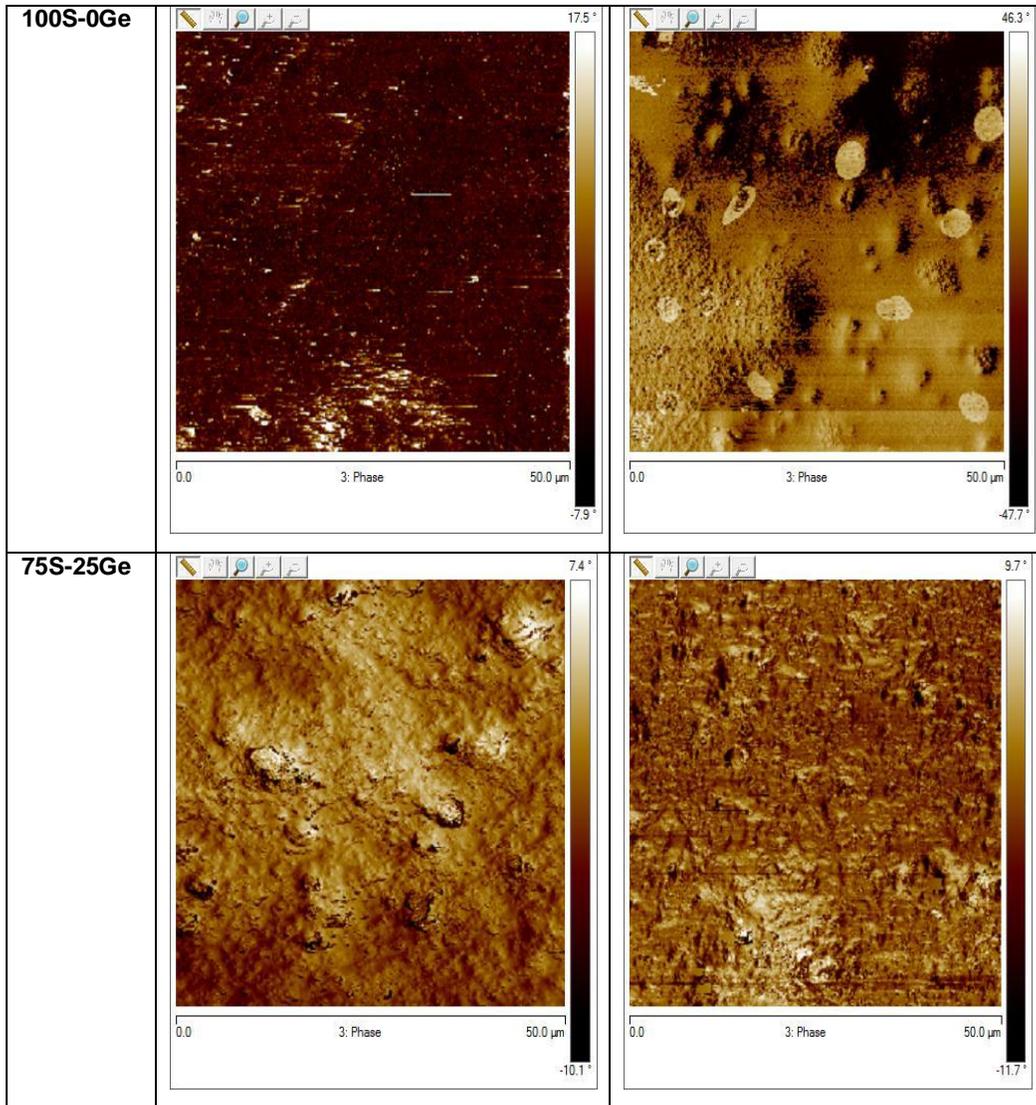


Figura IV.2.10. AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (mode PHASE 50 x 50μm) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

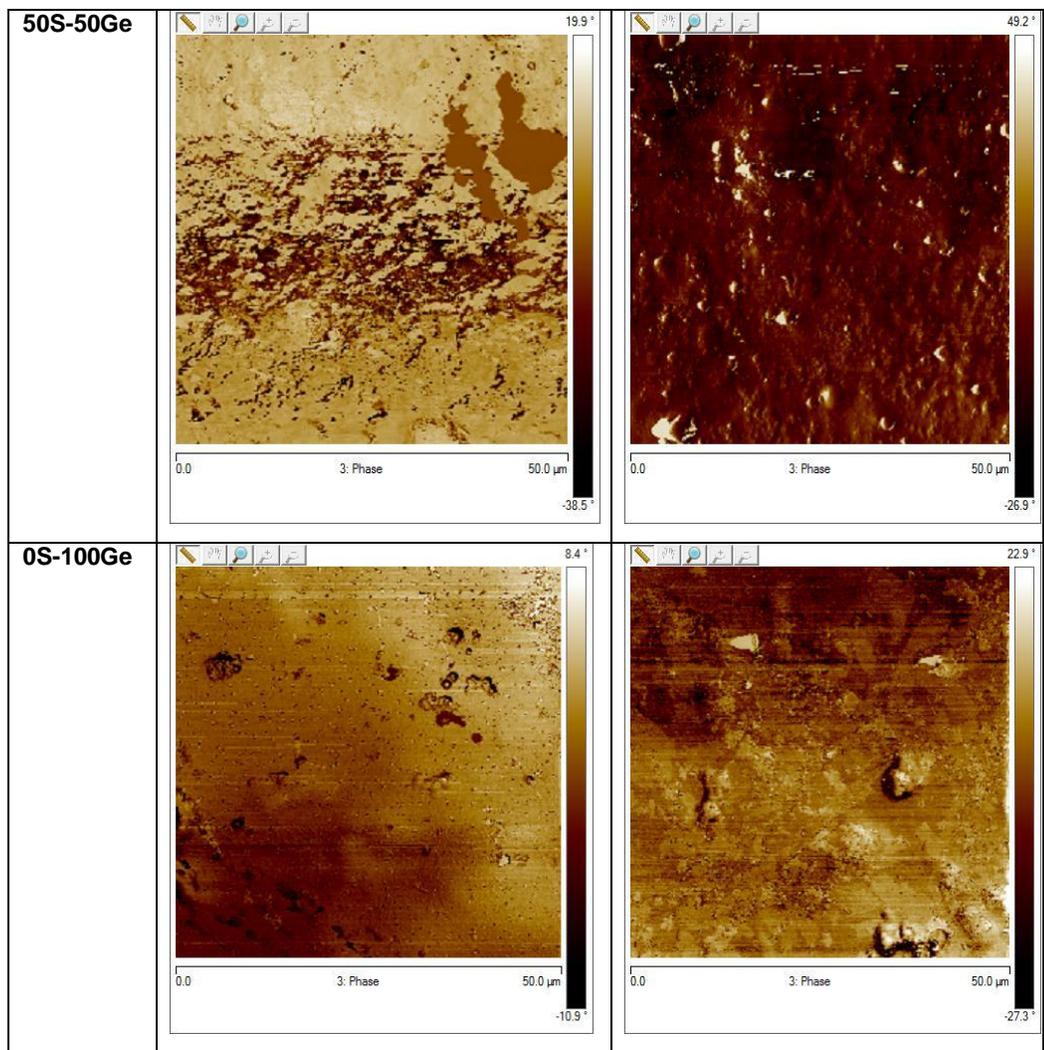


Figura IV.2.10. AFM de films de almidón de yuca y gelatina bovina (mode PHASE 50 x 50 μ m) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

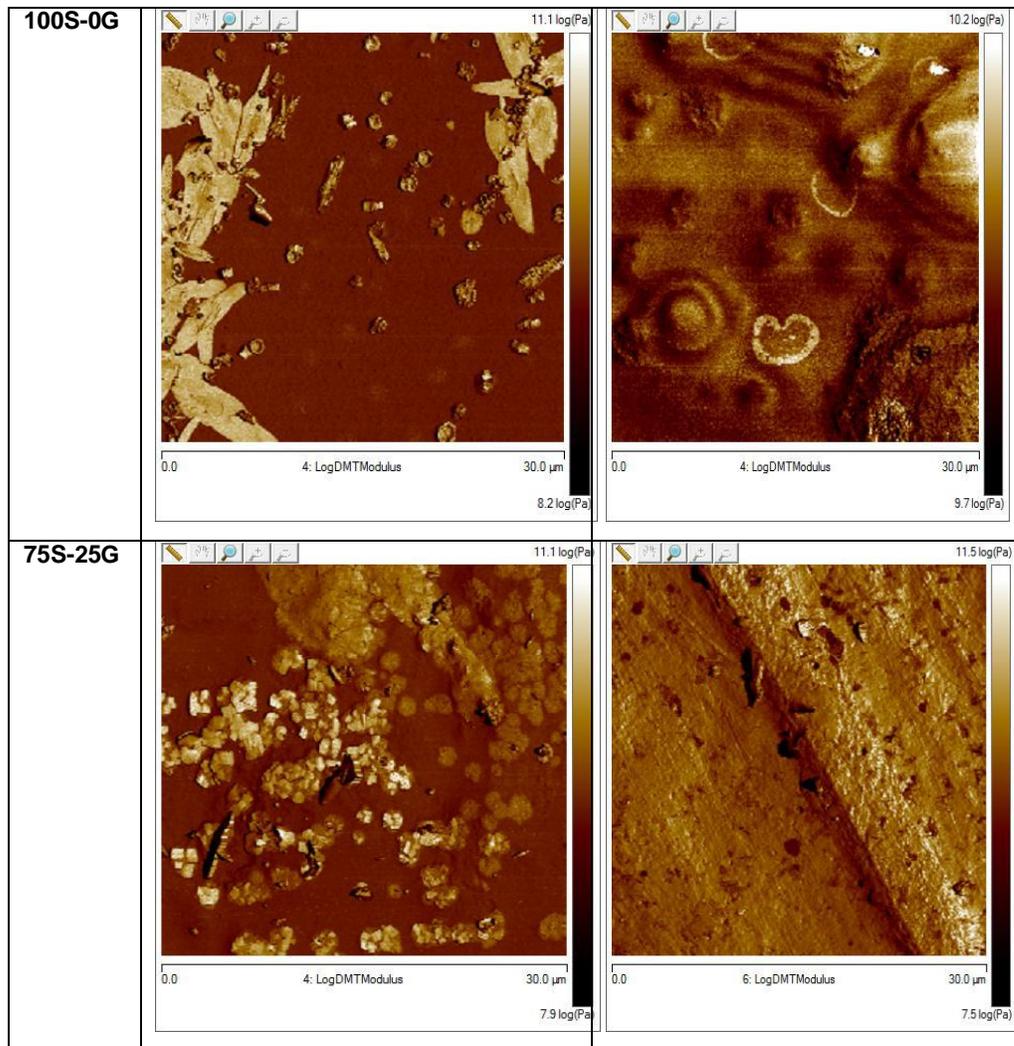


Figura IV.2.11. Micrografías obtenidas por AFM (peak force mode (logDMT) 30x30 μ m) de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

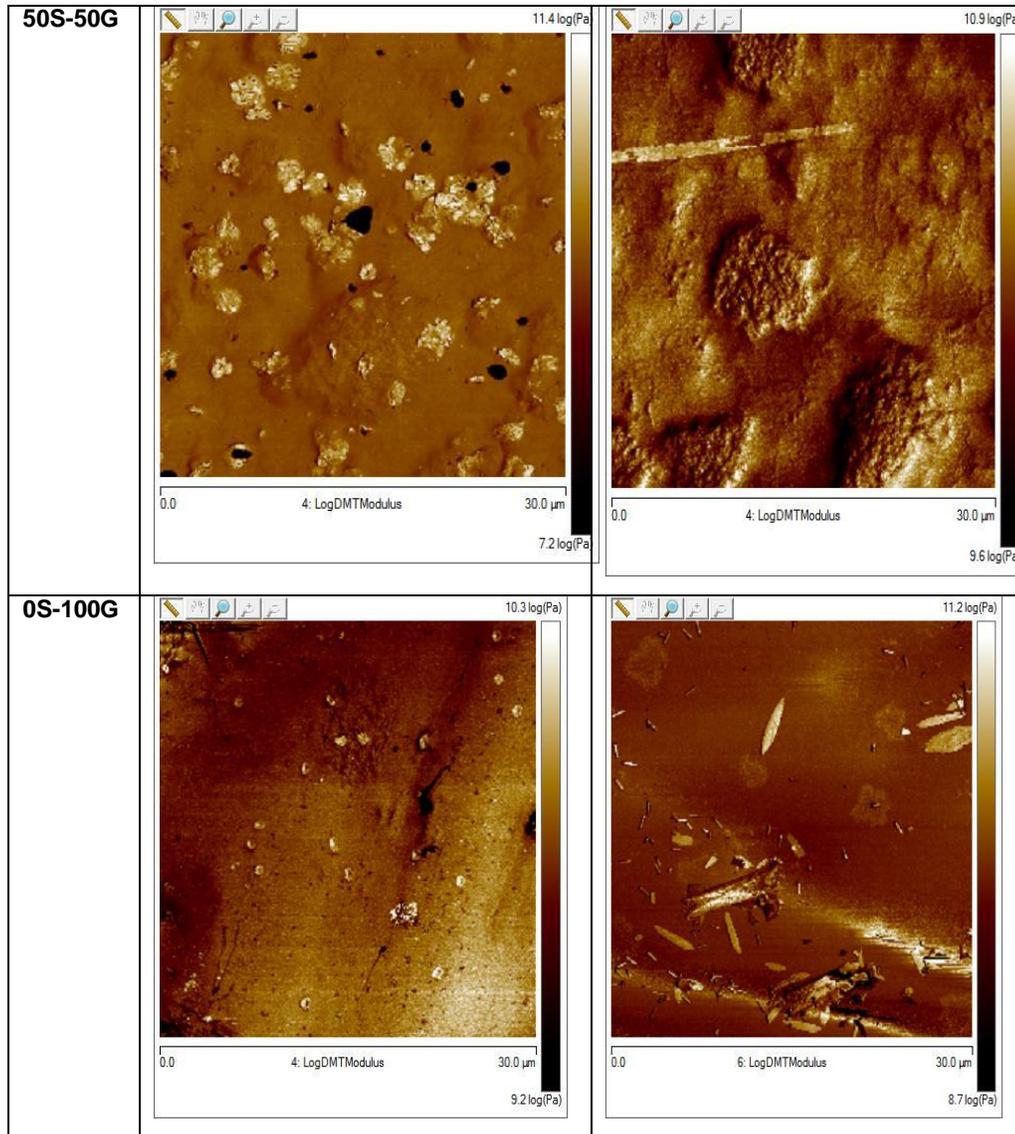


Figura IV.2.11. Micrografías obtenidas por AFM (peak force mode (logDMT) 30x30μm) de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

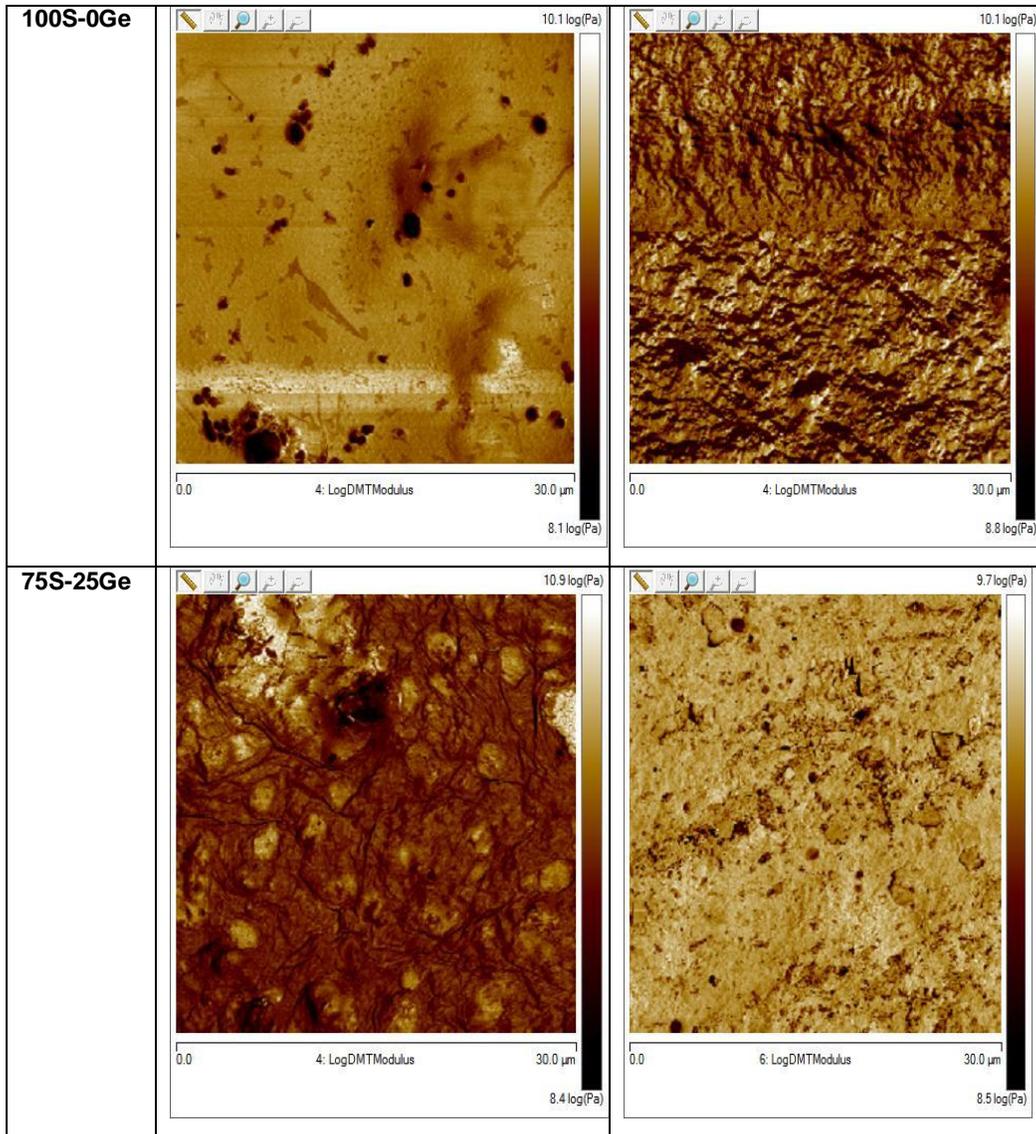


Figura IV.2.12. Micrografías obtenidas por AFM (peak force mode (logDMT) 30x30 μ m) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

(Continua)

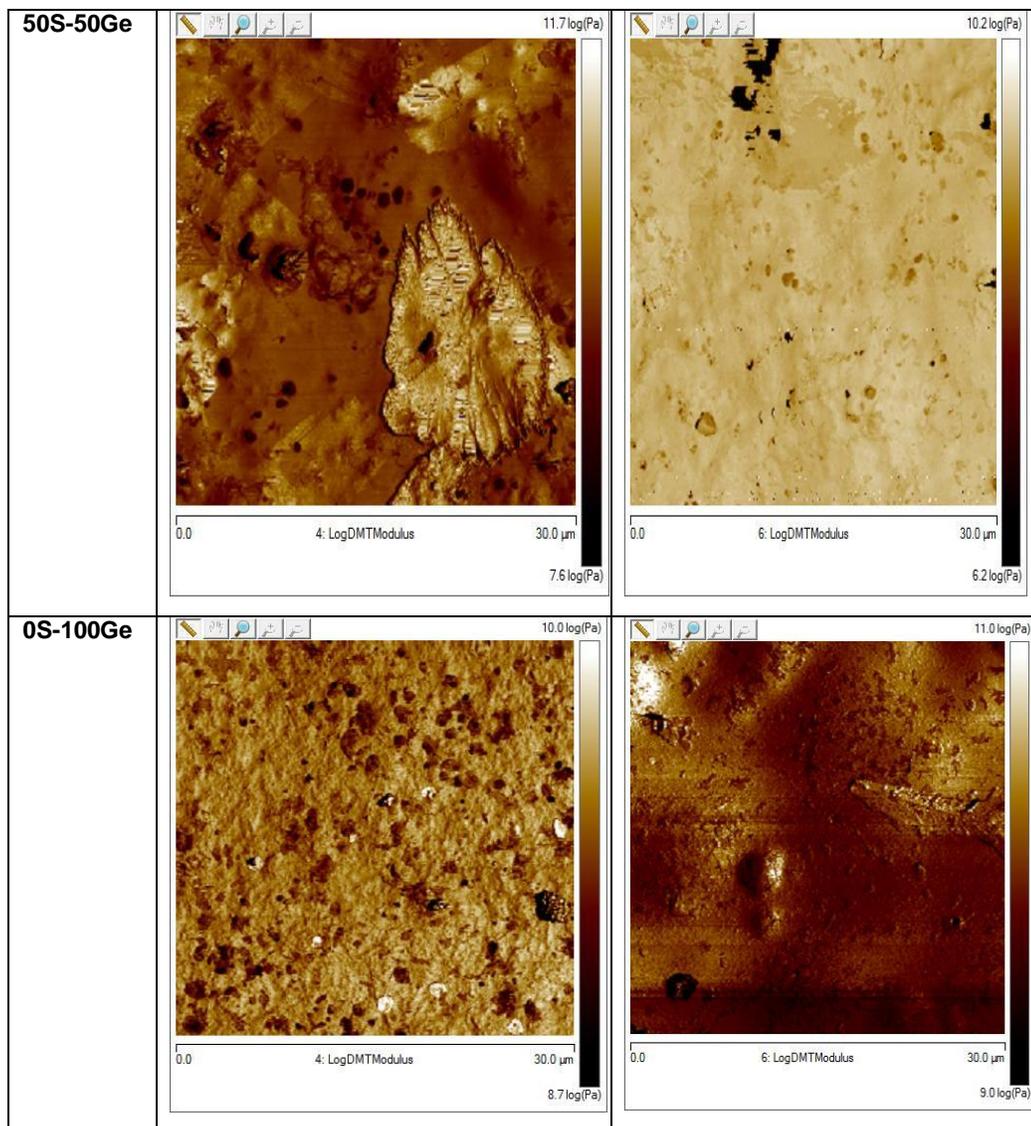


Figura IV.2.12. Micrografías obtenidas por AFM (peak force mode (logDMT) 30x30 μ m) con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 53% de HR).

IV.2.2. ANÁLISIS TÉRMICO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).

Para profundizar en el conocimiento de las propiedades estructurales de los films, también se analizaron las propiedades térmicas de los mismos, a partir de la calorimetría diferencial de barrido, tal y como se detalla a continuación.

Los termogramas típicos de las diferentes formulaciones obtenidos en el equipo DSC para cada uno de cuatro intervalos de temperatura considerados (1^{er} tramo: calentamiento desde 25°C hasta 160°C; 2^o tramo: enfriamiento hasta 0°C; 3^{er} tramo: calentamiento hasta 200°C; cuarto tramo: enfriamiento hasta 25°C) se muestran en las Figuras IV.2.13 y IV.2.14 para las muestras sin lípido y con lípido, respectivamente.

En el primer barrido de calentamiento se observan los endotermos correspondientes a la evaporación del agua ligada a la matriz polimérica (crisol perforado) y, en el caso de la matriz pura de gelatina y sus mezclas, el endotermo de fusión del polímero (entorno a 94°C), asociado con la disociación de los segmentos ordenados de la triple hélice (Roussanova et al, 2012), que se solapa con el endodermo de vaporización del agua. Estos valores de temperatura de fusión de la gelatina coinciden con los encontrados por Badii et al. (2006) y Roussanova et al., 2012 (84°C), aunque existe una gran variabilidad en los datos de la bibliografía dependiendo del tipo de

gelatina, presencia de plastificantes y contenido en humedad de los films. En el caso de las muestras con lípido, aparece además el endotermo de fusión del lípido, en torno a 58°C.

En el segundo y cuarto tramo de enfriamiento, se aprecian claramente exotermos de cristalización del lípido, en las muestras con este componente. No se aprecia prácticamente en ningún caso reordenación de los segmentos de la gelatina, indicando que después del calentamiento no se recupera la forma cristalina durante el tiempo del ensayo. En el tercer tramo de calentamiento hasta 200°C, se observa la transición vítrea de la matriz polimérica, alrededor de 166°C y 66°C, para el almidón y la gelatina puros respectivamente. Los valores de Tg encontrados para el almidón de yuca son del orden de los encontrados en la bibliografía para otros almidones (entre 150-180°C) (Norman et al., 1998; García et al., 2000a; Delville et al., 2003; Chien-Hsien et al., 2009; Avena-Bustillo et al. (2011) encontraron valores de Tg para gelatina de pescado de 54°C.

Para los films mixtos, se aprecian dos transiciones correspondientes a las dos fases ricas en almidón y gelatina, respectivamente: 155-160°C para la primera y 88-99°C para la segunda. El incremento en la Tg de la fase rica en gelatina y el descenso de la Tg de la fase rica en almidón demuestran la miscibilidad parcial de ambos componentes. Parte de las moléculas de almidón interaccionan en la fase amorfa de gelatina, aumentando su Tg debido a su mayor peso

molecular y parte de las moléculas de gelatina están presentes en la fase rica en almidón disminuyendo su Tg.

La incorporación del lípido a la matriz supuso una disminución significativa de la Tg de la matriz de almidón, lo cual también ha sido observado en trabajos previos para otros lípidos en almidón de maíz (Jiménez et al. 2013). Este efecto plastificante ha sido explicado en base a la formación de amilosa-lípido (Singh et al. 2002) que conlleva la disminución de la proporción de amilosa en la fase amorfa. Los valores de la Tg de la amilosa son mayores que los de la amilopectina debido a la mayor longitud de la cadena y la ausencia de ramificaciones (Bizot et al., 1997; Gou et al., 2011). Su separación de la matriz amorfa durante la formación de complejos supone un descenso global de la Tg de la mezcla.

Tabla IV.2.2. Temperatura de transición vítrea (Tg) de las diferentes matrices estudiadas (1: gelatina; 2: almidón) obtenidas por DSC a tiempo inicial de almacenamiento. Media y (desviación estándar).

FILMS	Tg ₁ (°C)		Tg ₂ (°C)	
	T(°C) INICIAL	T (°C) MEDIA	T(°C) INICIAL	T (°C) MEDIA
100S-0G	--	--	160 (1) ^a	166(3) ^a
100S-0Ge	--	---	141(13) ^b	145(14) ^b
75S-25G	90(1) ^a	98(8) ^a	145(2) ^{ab}	154(10) ^{ab}
75S-25Ge	82(2) ^b	91(2) ^a	147(18) ^{ab}	153 (15) ^{ab}
50S-50G	92(5) ^a	98(6) ^a	152 (11) ^{ab}	158 (11) ^{ab}
50S-50Ge	93 (2) ^a	99(4) ^a	152(16) ^{ab}	155(16) ^{ab}
0S-100G	61(5) ^c	66(5) ^b	---	---
0S-100Ge	---	---	---	---

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. (p < 0.05).

Tabla IV.2.3. Temperatura de fusión del lípido (inicial, media y final) y entalpia de fusión para las distintas formulaciones con lípido. Media y (desviación estándar).

FILMS	T^a (°C) INICIAL	T^a (°C) MEDIA	T^a (°C) FINAL	ΔH (J/g film)
100S-0Ge	53,3(0,4) ^(ab)	58,9 (0,6) ^(a)	61,8(0,7) ^(a)	10(2) ^(a)
75S-25Ge	53,7(0,3) ^(a)	58,5(0,4) ^(a)	61,7(0,3) ^(a)	11(2) ^(ab)
50S-50Ge	53,2(0,1) ^(cb)	59,1(0,1) ^(a)	61,7(0,3) ^(a)	9(1) ^(a)
0S-100Ge	52,7(0,1) ^(c)	58,9(0,2) ^(a)	61,6(0,4) ^(a)	16(5) ^(b)

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

Solo en el caso de las formulaciones con lípido aparece el exotermo de fusión de éste al alrededor de 59°C (Tabla IV.2.3). Al comparar la entalpía de fusión del lípido en las diferentes formulaciones se observa que es significativamente mayor ($p < 0.05$) en los films de gelatina pura, lo que podría indicar que el lípido está menos ligado al polímero facilitando esto su cristalización. En el film de almidón se da el menor valor de la entalpía lo que podría sugerir que el lípido está más ligado a la matriz a través de la formación complejos lípido-polímero, como revelan las observaciones microscópicas. En los films mixtos, los valores son del orden de los de almidón para la formulación con 25% de gelatina e inferiores para los films con 50 % de gelatina. La mayor complejidad composicional de esta mezcla podría inhibir la cristalización del lípido.

Al expresar los valores de entalpía por gramo de lípido, se obtuvieron valores similares al encontrado para el lípido puro, alrededor de 100 J/g (Figura IV.2.15), con lo que no se puede concluir con los datos obtenidos, si la cristalización del lípido se vio afectada o no por el tipo de matriz.

En conclusión del análisis calorimétrico se desprende que almidón y gelatina presentan miscibilidad parcial lo que supone la formación de dos fases interpenetrantes (según deduce de la microestructura) en el film: una de almidón con T_g inferior a la del almidón puro y otra de gelatina con mayor T_g que la gelatina pura. En esta última se forman

zonas cristalinas debido a la asociación de las cadenas helicoidales de la proteína en forma de triple hélice.

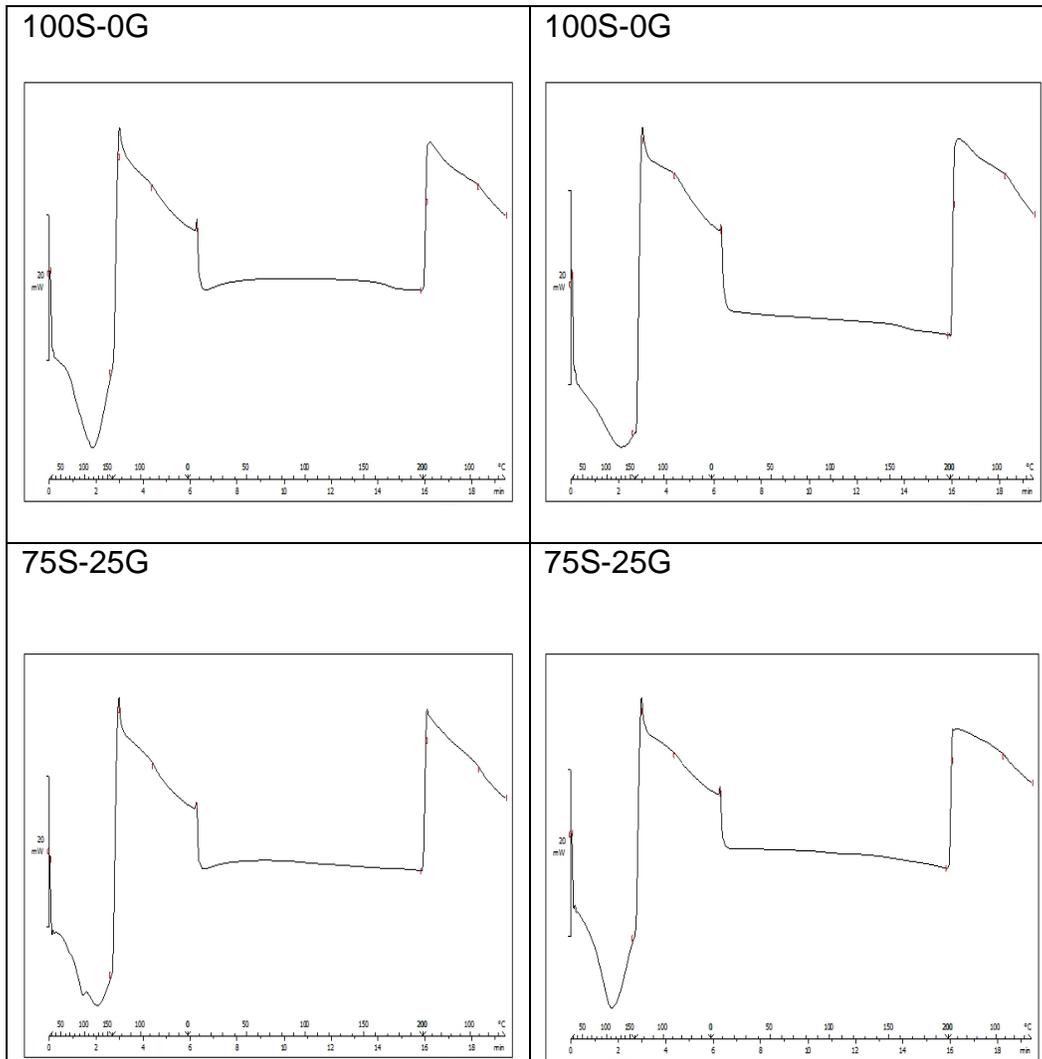


Figura IV.2.13. Termogramas típicos obtenidos por DSC de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 0% de HR). (Continúa)

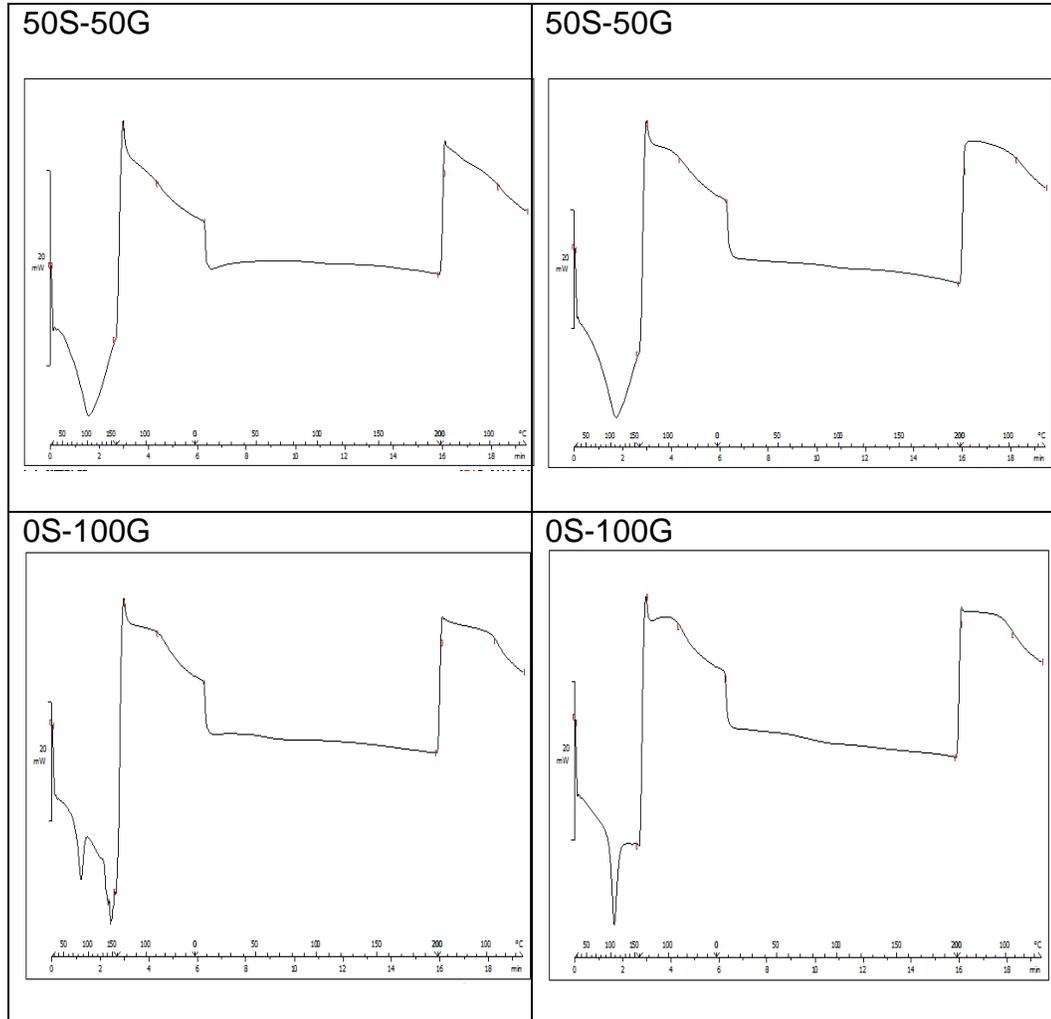


Figura IV.2.13. Termogramas típicos obtenidos por DSC de films de almidón de yuca y gelatina bovina sin lípido a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 0% de HR).

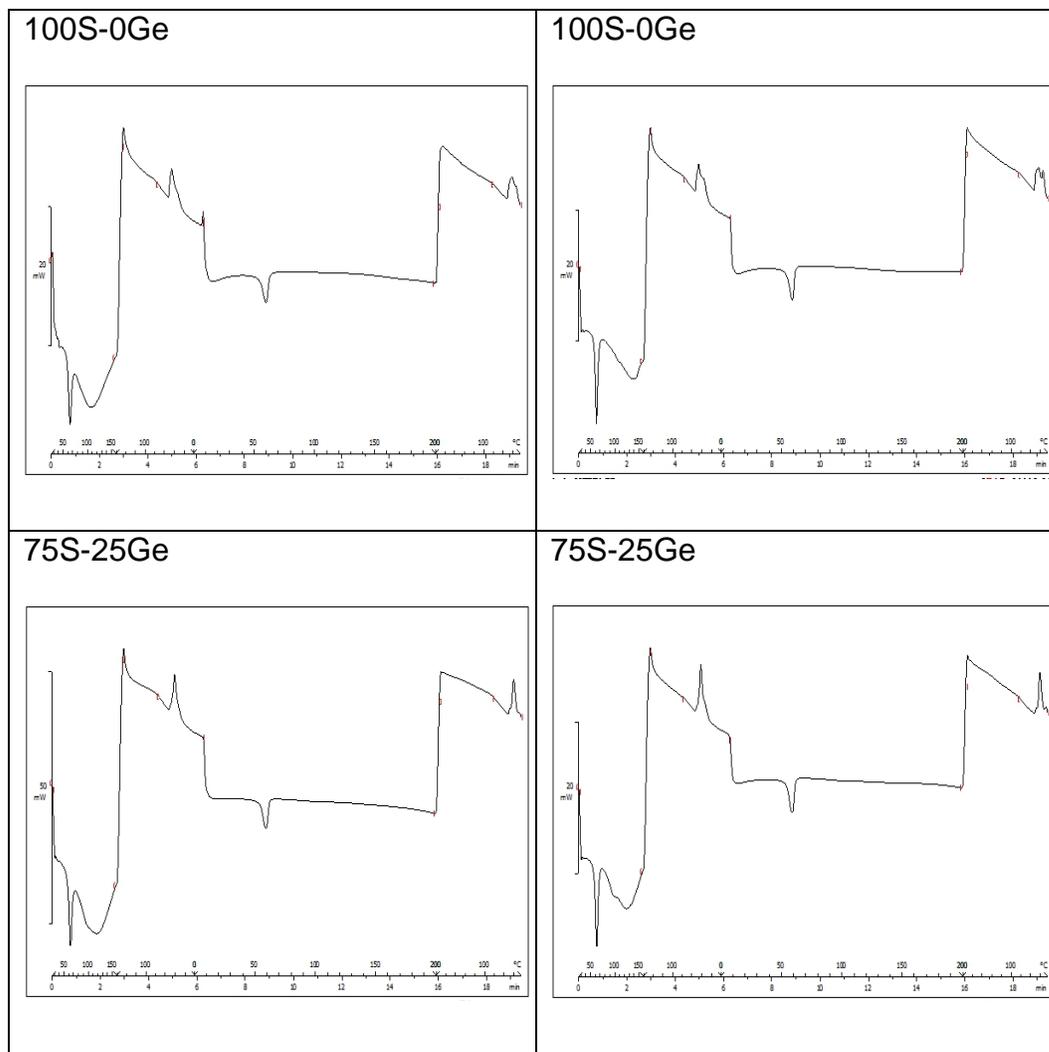


Figura IV.2.14. Termogramas típicos obtenidos por DSC de films de almidón de yuca y gelatina bovina con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 0% de HR).

(Continua)

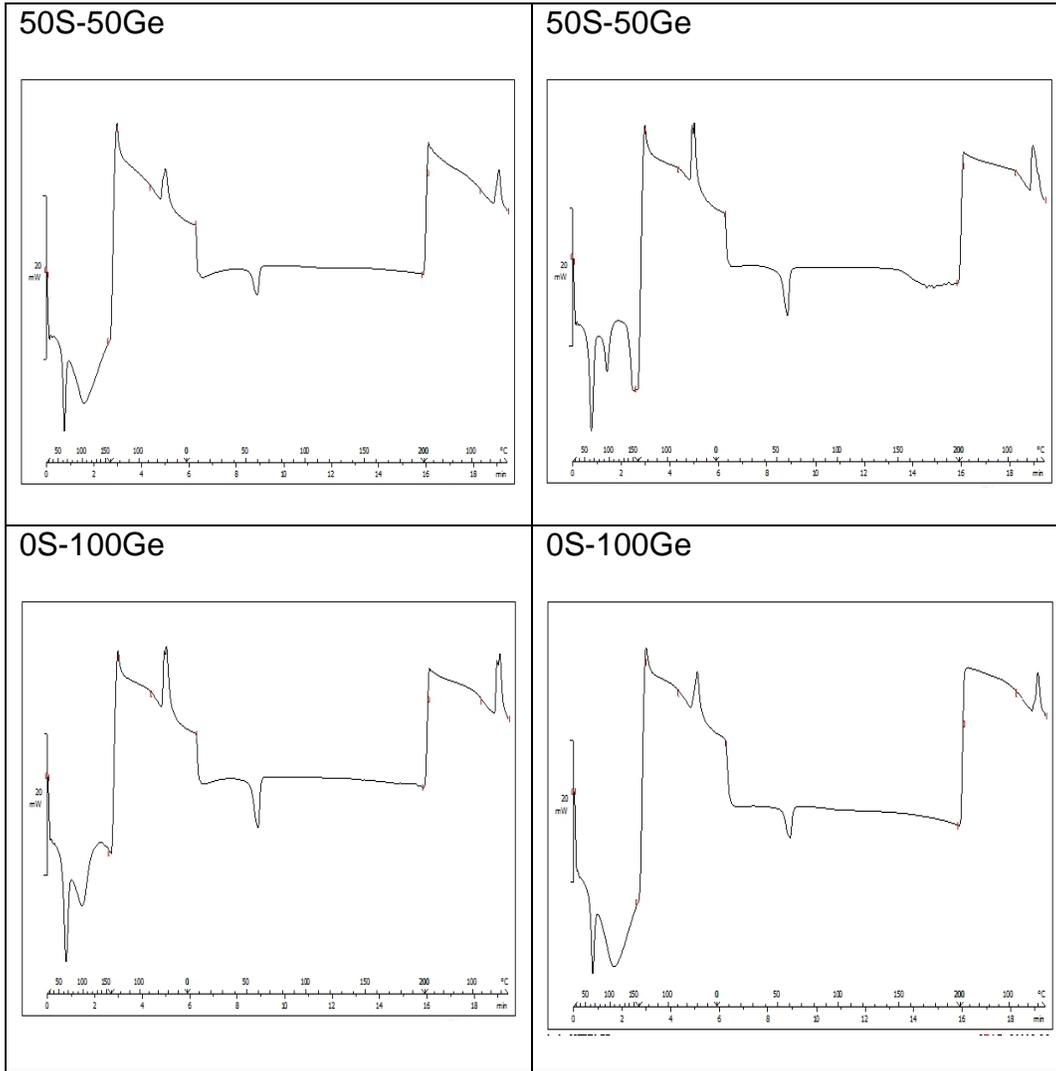


Figura IV.2.14. Termogramas típicos obtenidos por DSC de films de almidón de yuca y gelatina bovina con lípido E471, a 1 semana y 5 semanas de almacenamiento (25°C y 0% de HR).

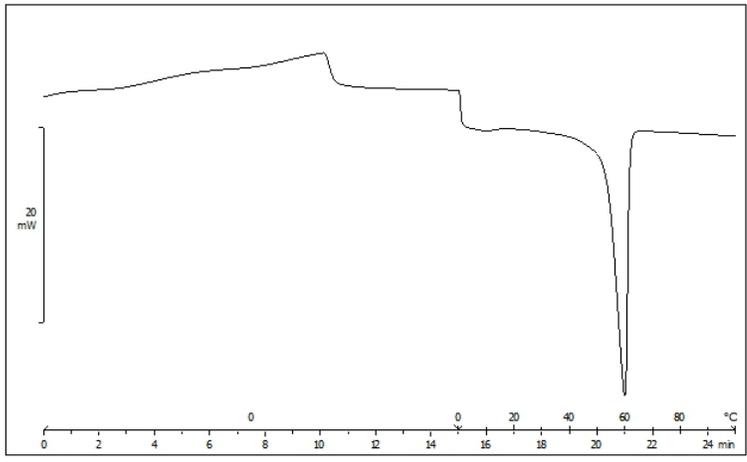


Figura IV.2.15. Termograma con la Cristalización del Lípido.

IV. CAPITULO 3
PROPIEDADES FISICAS Y ANTIFUNGICAS DE
FILMS DE ALMIDON-GELATINA CON
ACEITES ESENCIALES

IV.3.1. MICROESTRUCTURA DE LOS FILMS

La microestructura de los films con aceites esenciales fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM). En la figura IV.3.1 se muestran las micrografías de la superficie y del corte transversal de muestras de los films mixtos almidón gelatina (50S-50G) y de los mismos con incorporación de cada uno de los aceites esenciales: canela (50S-50G-C), clavo (50S-50G-CL) y orégano (50S-50G-O).

La microestructura formada durante la obtención de los films ofrece información relevante respecto a la forma en que se incorporan los aceites esenciales, así como su influencia en los mecanismos de transferencia de vapor de agua u oxígeno y en su resistencia mecánica (Quezada et al., 2000). La interacción con la luz que determina las propiedades ópticas está también afectada por los aspectos microestructurales (Trezza y Krochta, 2001). La estructura final esta a su vez muy relacionada con las características estructurales y estabilidad de la emulsión formadora de film y los diferentes mecanismos de desestabilización: floculación, coalescencia y cremado que ocurren durante la etapa de secado, y que determinan la distribución final del lípido en la matriz.

Las observaciones por SEM de la superficie de los films muestran que los films mixtos de almidón-gelatina presentan el aspecto heterogéneo e irregularidades, con zonas redondeadas de aspecto

de grandes gotas, ya comentada en el punto anterior. Este aspecto revela la falta de compatibilidad total de los polímeros de gelatina y almidón con la consiguiente formación de dos fases líquidas: una rica en almidón y otra en gelatina que generan dos redes poliméricas que se interpenetran durante el secado. Los problemas de miscibilidad de los polímeros se presentan ya en la fase de preparación de la dispersión formadora de film, como han descrito Hassan et al. (2009 y 2012) para geles de almidón-gelatina. Durante el secado, al aumentar la concentración de los polímeros, aumenta la incompatibilidad termodinámica entre ellos, produciéndose fenómenos de asociación y agregación de cadenas con separación de fases en la formación de la matriz. En concreto, las cadenas de gelatina forman zonas de asociación de cadenas a través de triples hélices como en el colágeno original que tras el secado se manifiestan como zonas fibrosas diferenciadas en la matriz amorfa del almidón. En la superficie del film, estas zonas emergen en forma redondeada probablemente por corresponder a las gotas de la disolución rica en gelatina que emigraron a la superficie del film durante el secado, tal como se comentó en el capítulo IV.1.

La incorporación de los AE también introdujo irregularidades en la superficie de los films debido a la baja miscibilidad de estos componentes lipídicos con los componentes de ambas matrices. Los aceites se dispersan en forma de emulsión en la disolución formadora de film y durante el secado ocurren procesos de

floculación, coalescencia y cremado que llevan parte del aceite a la superficie del film. La presencia de lípidos en la superficie es clara para el aceite esencial de clavo, donde se aprecia la huella de las gotas del lípido, tras su evaporación durante el acondicionamiento del film o durante la observación microscópica a alto vacío. No obstante para los aceites de canela y orégano, la huella del lípido no es tan evidente aunque se aprecia una topografía superficial diferente a la del film control, sin aceite esencial, que revela la presencia superficial de aceite en algún momento de la preparación del film.

En la figura IV.3.1 se muestran también las micrografías del corte transversal de los diferentes films. Los films control (50S-50G) muestran zonas de asociación de las cadenas de los polímeros, embebidas en una matriz amorfa. Tal como se ha comentado, estas zonas fibrosas han sido descritas en trabajos previos de films de gelatina y se corresponden con zonas de asociación de cadenas de gelatina a través de sus regiones helicoidales (Hassan y Norziah, 2012). La incorporación de aceites esenciales dio lugar a una mayor heterogeneidad de la estructura. En las imágenes pueden observarse numerosas cavidades, que se corresponden con la posición de las gotas del aceite esencial, el cual se evapora parcialmente en la superficie crio-fracturada durante la observación por SEM debido al alto vacío. El aspecto corresponde a gotas alargadas, lo cual se justifica por las deformaciones producidas en las mismas durante el secado del film y el consiguiente empaquetamiento de las cadenas

de polímeros, como se ha descrito en trabajos previos (Sánchez et al., 2011, Ahmad et al., 2012). El film con aceite esencial de orégano presenta una estructura porosa, pero sin gotas bien diferenciadas, lo que sugiere la coalescencia de las mismas durante el secado del film y la formación de canales de aceite esencial que quedan atrapados en la matriz polimérica. La proporción de zonas porosas es superior cerca de la superficie libre del film durante su secado, en coherencia con el cremado del aceite hacia esa parte superior. La parte inferior del film es prácticamente homogénea. Estos resultados apuntan a una mayor inestabilidad de la emulsión de aceite de orégano durante el secado del film.

El aspecto de los films con aceites esenciales es similar al descrito en trabajos previos para films de quitosano y HPMC con aceites esenciales (Sánchez-González et al., 2011). Las diferencias en la distribución del aceite esencial en la matriz están relacionadas con su diferente composición, volatilidad y afinidad (interacciones) con los polímeros de la matriz. La estructura de los films y la distribución de las gotas de aceite puede afectar a sus propiedades, como se ha descrito en estudios previos en films gelatina con aceites esenciales (Ahmad et al., 2012), almidón con ácidos grasos (Jiménez et al., 2012) y para matrices de HPMC y quitosano (Sánchez-González et al., 2011) con aceites esenciales.

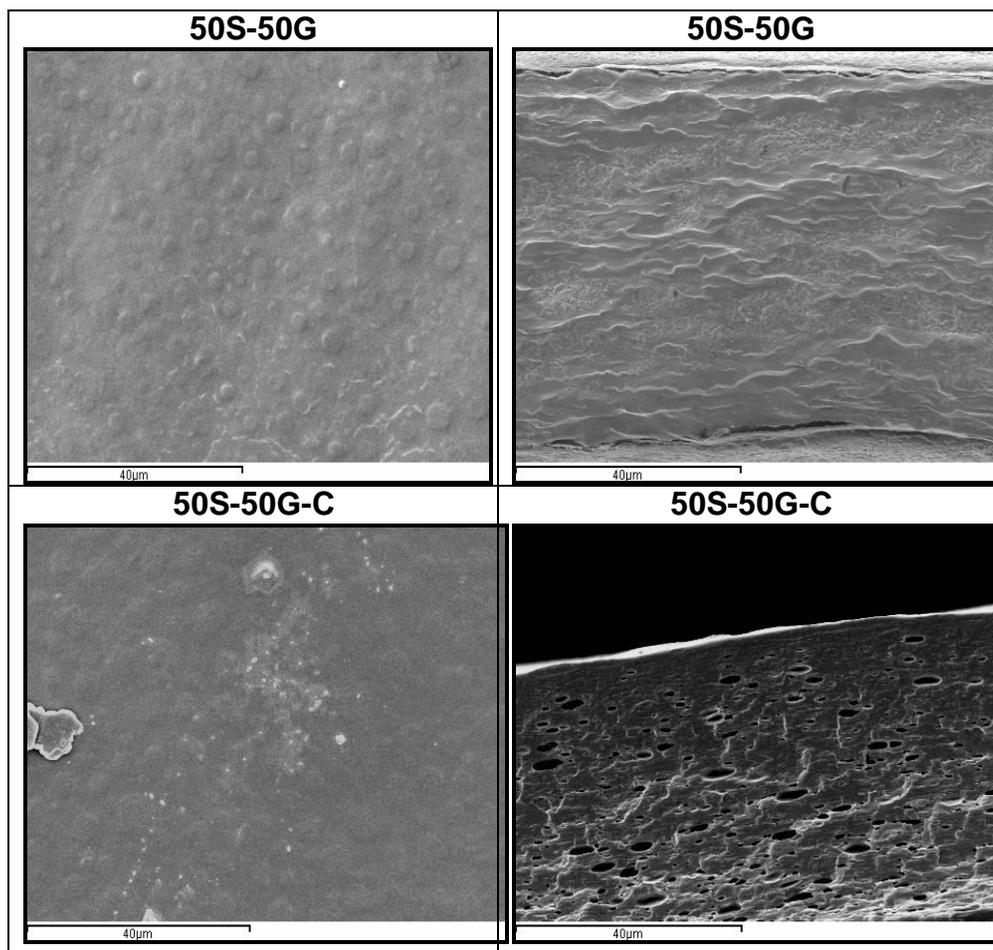


FIGURA IV.3.1. Observaciones microestructurales (SEM) de la superficie (columna de la izquierda) y sección transversal (columna de la derecha) de films almidón-gelatina (50S-50G), con AE de canela (C), clavo (CL) y orégano (O).

(Continua)

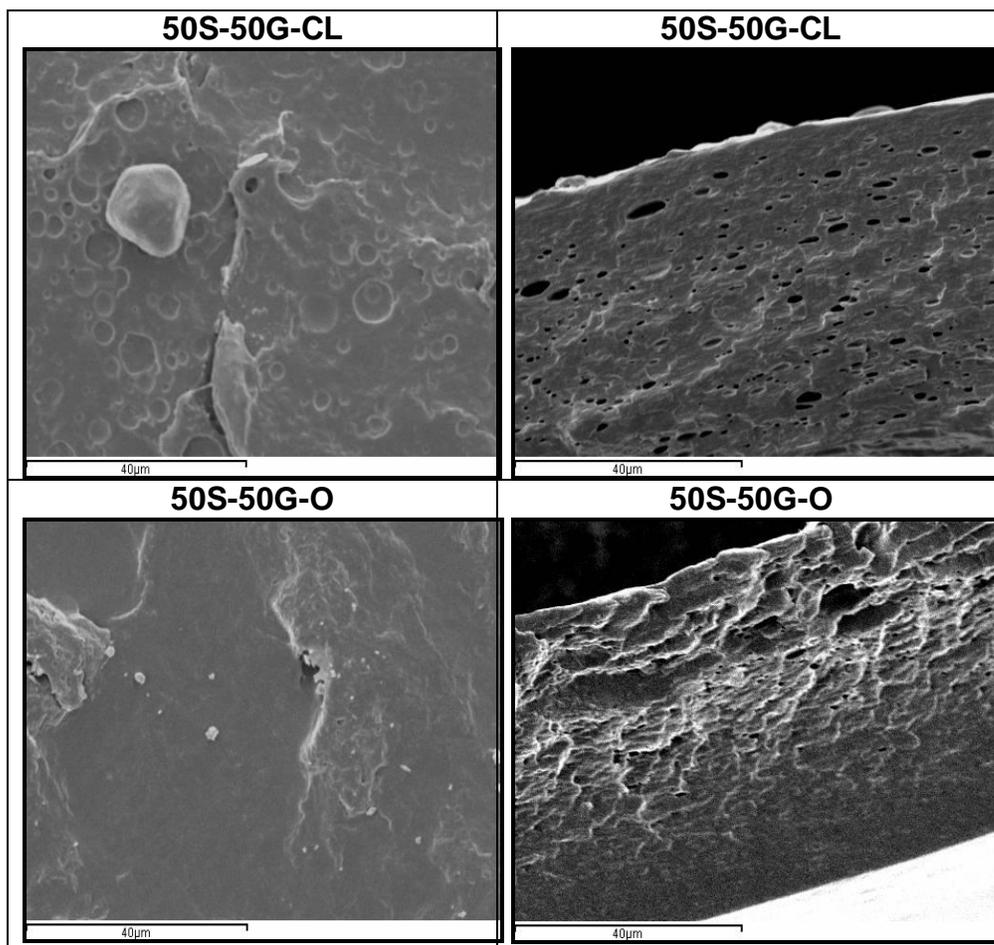


FIGURA IV.3.1. Observaciones microestructurales (SEM) de la superficie (columna de la izquierda) y sección transversal (columna de la derecha) de films almidón-gelatina (50S-50G), con AE de canela (C), clavo (CL) y orégano (O).

IV.3.2. PROPIEDADES BARRERA Y PÉRDIDAS DE ACEITE ESENCIAL DE LOS FILMS

En la tabla IV.3.1, se observan los valores promedio de permeabilidad al vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO) de los films almidón-gelatina, con y sin AE, equilibrados a 53% de H.R. y 25°C. Además se incluyen, los valores promedio de la pérdida de aceite esencial durante el secado de los films, evaluados a través de la pérdida de peso de los sólidos totales inicialmente extendidos para la formación del film.

Estos resultados muestran que los films con AE de orégano son los que más peso pierden ($p < 0.005$) durante el secado (66%), en comparación con los otros films, con aceite de clavo y canela. Esto está relacionado con la mayor volatilidad (de los componentes mayoritarios del AE de orégano (50% de carvacrol y 21% de thymol) en comparación con los otros AE utilizados de canela (60% de eugenol) y clavo (90% de eugenol) (ver tabla IV.1.1 de materiales y métodos). Durante la etapa de evaporación del agua, los compuestos volátiles del aceite son arrastrados con el vapor de agua, hasta un determinado nivel de secado del film en que la viscosidad del sistema es suficientemente elevada para provocar su encapsulación en la matriz. Después del secado del film, la liberación de aceite es muy

lenta y este queda retenido por encapsulación en la matriz polimérica.

Tabla IV.3.1. Propiedades barrera al vapor de agua y al oxígeno de los films y pérdida de aceite esencial durante la etapa de secado en films almidón-gelatina (50S-50G), con AE de canela (C), clavo (CL), orégano (O), equilibrados a 53% de HR y 25°C. Valores medios, desviaciones y resultados del ANOVA.

FILMS	PVA (g.mm/kPa.h.m²)	POx10⁻¹³ (cm³/m.seg.Pa)	Perdida de aceite (%) ⁽¹⁾
50S-50G	5,9(0,4) ^a	0,52(0,10) ^a	-
50S-50G-C	4,2(0,2) ^b	0,39(0,02) ^b	59(4) ^b
50S-50G-Cl	4,2(0,2) ^b	0,43(0,02) ^b	56(2) ^b
50S-50G-O	4,6(0,4) ^b	0,358(0,005) ^b	66(4) ^a

⁽¹⁾ Porcentaje de pérdida durante el secado del film respecto a la cantidad inicial incorporada en la dispersión formadora de film

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo. ($p < 0.05$).

La incorporación de los AE a los films de gelatina-almidón provocó un descenso de la permeabilidad al vapor de agua, como cabe esperar por el incremento del carácter hidrófobo. Las moléculas de agua deben difundir mayoritariamente por la fase polimérica continua, donde la presencia de gotas lipídicas supone discontinuidades que provocan un incremento efectivo del factor de tortuosidad al

transporte de la matriz. No se encontraron diferencias significativas en los valores de la PVA entre los films de los diferentes AE.

El efecto de los aceites esenciales sobre las propiedades de barrera al vapor de agua de los films ha sido analizado en trabajos previos y se han obtenido resultados diversos. Este efecto depende de diferentes factores estructurales, como el tipo de matriz, la composición y dosis de aceite esencial incorporado y las interacciones con la matriz (Sánchez-González et al., 2011). El proceso de transporte de vapor de agua en los films depende de la proporción del carácter hidrofílico-hidrofóbico de la matriz y de la microestructura final alcanzada.

Sánchez-González et al. (2011) encontraron una reducción de la PVA en matrices de quitosano y HPMC al incorporar concentraciones de 0,5- 1 y 2% de aceites esenciales de árbol del té, limón y bergamota. En general, en ambas matrices a mayor concentración de AE incorporado, menor valor de PVA. El tipo de aceite influyó significativamente en esta propiedad en los films de HPMC. A concentraciones de AE del 2%, los films con aceites de cítricos (bergamota y limón) consiguieron reducir hasta un 50% los valores de PVA, mientras que los que contenían árbol del té sólo alcanzaron un 20% de reducción. Esto se explica por la mayor naturaleza hidrofóbica de los componentes mayoritarios de los aceite de cítricos (limoneno) comparada con la del aceite del árbol del té (terpineol). El

tipo de aceite afectó en menor medida a las matrices de quitosano por su mayor carácter hidrofílico.

No obstante, Bonilla et al., 2013 encontraron un incremento de la PVA para incorporaciones de aceite esencial de tomillo y albahaca al 1 % en una matriz de quitosano cuando la homogenización de la dispersión formadora de film se realizó con un equipo rotor-stator, aunque no hubo cambios en la permeabilidad cuando la proporción de aceite fue del 0,5 %. Sin embargo, cuando las dispersiones se sometieron a una homogenización más intensa con microfluidificador, los valores de la permeabilidad se redujeron en un 50 % respecto a los de la matriz sin aceites con concentraciones de aceite del 0,5 %, sin cambios en la misma para el 1% de aceite.

Kechichian et al. (2010) encontraron en films de almidón de yuca que la adición de canela y clavo en polvo (0,2 g/100 g de film) disminuyó la PVA, mientras que cantidades superiores aumentaron el valor de esta propiedad.

Ahmad et al. (2012), en matrices de gelatina, encontraron un efecto diferente al incorporar aceites esenciales de bergamota y limón. A concentraciones de aceite de bergamota mayor del 5%, el valor de PVA aumentó ligeramente en los films, mientras que en los que contenían aceite de limón disminuyó la PVA, lo que se relacionó con la diferente naturaleza hidrofóbica de estos aceites. Las interacciones de los componentes del aceite con las partes hidrofóbicas de las

proteínas podría potenciar el descenso del carácter hidrofóbico de la matriz (Perez-Gago y Krochta, 2001).

Los valores de la PO también mostraron un descenso significativo con la incorporación de los AE respecto a los valores del film control, sin diferencias significativas entre el efecto de los distintos aceites. La incorporación de lípidos líquidos supone, en general, un aumento en la permeabilidad al oxígeno de los films por la mayor solubilidad del gas en la fase lipídica (Fabra et al., 2012). No obstante, en otros trabajos (Bonilla et al. 2013) con films de almidón-quitosano (en proporción 4:1) también se ha observado el incremento en las propiedades barrera al oxígeno (reducción de la permeabilidad en un 50 %) con la adición de diferentes antioxidantes, entre ellos aceites esenciales de tomillo y albahaca. La menor solubilidad del oxígeno en estos aceites más polares que los triglicéridos, y la presencia de compuestos antioxidantes que pueden ejercer un bloqueo químico al gas, son la causa del efecto positivo de los aceites esenciales en las propiedades de barrera al oxígeno de los films.

IV.3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS

Los valores de los parámetros mecánicos de los diferentes films compuestos, con y sin AE, se muestran en la tabla IV.3.2. En general, los resultados obtenidos muestran pocos cambios en las propiedades mecánicas por efecto de la incorporación de los AE. Los

valores del módulo de elasticidad (ME), y la tensión de fractura (TS) y deformación hasta el punto de fractura (%E) en el punto de fractura no son significativamente diferentes entre el film control y los films con los diferentes aceites.

Tabla I.V.3.2. Propiedades mecánicas de los films almidón-gelatina (50S-50G), con y sin AE de canela (C), clavo (CL), orégano (O), equilibrados a 53% de H.R. y 25°C. Valores medios, desviaciones y resultados del ANOVA.

FILMS	ME(MPa)	TS(MPa)	E (%)
50S-50G	627(54) ^{ab}	24(2) ^a	14(4) ^{ab}
50S-50G-C	775(119) ^b	25(2) ^{ab}	8(3) ^a
50S-50G-Cl	642(71) ^{ab}	25(3) ^{ab}	17(3) ^b
50S-50G-O	612(213) ^a	22(2) ^b	12(3) ^{ab}

a, b, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo. ($p < 0.05$).

En estudios previos, se han observado efectos diversos de la incorporación de AE a matrices poliméricas. Sánchez-González et al. (2011) encontraron tendencias similares en films a base de HPMC y quitosano, al incorporar diferentes concentraciones de aceites esenciales (0,5- 1 y 2%). En general, la adición del aceite esencial provocó un descenso en el ME, TS y %E. El tipo de aceite esencial sólo afectó significativamente en los films de quitosano. Kechichian et

al. (2010) también encontraron un descenso en las propiedades mecánicas al incorporar canela y clavo en polvo a films de almidón. No obstante, Bonilla et al. (2013) encontraron un aumento de la rigidez y la tensión de fractura de films de almidón-quitosano (proporción 4:1) con aceite de albahaca, mientras que con aceite de tomillo los films sólo fueron ligeramente menos extensibles. Así mismo, Bonilla et al. (2013) observaron con films de quitosano, que la incorporación de aceites esenciales de tomillo y albahaca provocó un descenso significativo de la rigidez y tensión de fractura de los films, tanto más cuanto mayor fue la concentración de aceite y, especialmente, cuando su incorporación se hizo con microfluidificación. De forma paralela los films ganaron extensibilidad de forma muy significativa. Todos estos resultados apuntan a que el efecto de los aceites esenciales en las propiedades mecánicas de los films depende del tipo y concentración de AE, del tipo de matriz polimérica y de las interacciones específicas entre componentes (Ahmad et al. 2012), así como del tipo de homogenización que, a su vez, determina el área efectiva de interacción entre componentes en la interface polímero-aceite. En general, si la incorporación de aceites esenciales, u otros componentes no poliméricos inmiscibles con la matriz, se hace en dosis excesivas, se obtienen films con una gran cantidad de fase dispersa y una estructura demasiado heterogénea con un gran número de discontinuidades que hacen a la matriz demasiado frágil. Sin embargo, si el aceite esencial se incorpora en

el nivel y forma adecuados puede llegar a reforzarse el film a través de interacciones específicas entre componentes.

La escasa modificación en las propiedades mecánicas de los films de almidón-gelatina por la incorporación de los aceites esenciales en las proporciones utilizadas, pone de manifiesto que estas son adecuadas para mantener el comportamiento mecánico de los films en relación al film control sin detectarse efectos negativos.

I.V. 3.4. PROPIEDADES ÓPTICAS

En la tabla IV.3.3 se incluyen los valores de las propiedades ópticas evaluadas en los films. El brillo de los films está ligado a la morfología de su superficie (Sánchez-González et al., 2010) y, en general, cuanto más lisa - menos irregular, menos rugosa - es la superficie, más brillante es el film.

Los valores de brillo obtenidos indican que, la incorporación de los AE disminuyó el brillo en comparación con el film control. Los AE introducen irregularidades estructurales que afectan a la superficie del film, por la baja compatibilidad y miscibilidad de estos componentes con la matriz. Además al incorporar los AE, existe un efecto de dilución de la gelatina que es el componente que más brillo aporta a las formulaciones (Ahmad et al., 2012). El tipo de AE afectó al brillo de los films, siendo el aceite de orégano el que dio mayor brillo y el de canela el menor. La topografía superficial del film,

afectada por el nivel de cremado de las gotas durante la etapa de secado, y la posible exudación de aceite hacia la superficie en el film seco, son determinantes del brillo final.

Tabla IV.3.3. Propiedades ópticas de los films almidón-gelatina (50S-50G), con AE de canela (C), clavo (CL), orégano (O), equilibrados a 53% de H.R. y 25°C. Valores medios, desviaciones y resultados del ANOVA.

FILMS	Ti 480nm	Brillo 60°
50S-50G	81(0,04) ^a	37(4) ^a
50S-50G-C	91(0,5) ^b	12(2) ^d
50S-50G-CL	90(0,4) ^b	17(3) ^c
50S-50G-O	92(0,4) ^b	23(4) ^b

a, b, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo. ($p < 0.05$).

Los films control, presentan valores de transparencia, evaluados a través de Ti, menores (más opacos) que los que contienen AE a pesar de poseer una fase dispersa de aceite que podría contribuir a la dispersión de luz y al aumento de su opacidad. De hecho la incorporación de diferentes aceites esenciales a distintas concentraciones en matrices de quitosano y HPMC provocó en todos los casos un descenso de la transparencia (Sánchez-González et al.

2011). Sin embargo en los films de almidón-gelatina, los valores de T_i aumentaron significativamente con la incorporación de AE, con independencia del tipo de aceite. Esto podría explicarse por el hecho de que en la matriz de los films control ocurren fenómenos de cristalización del almidón y de la gelatina que pueden incrementar en gran medida su opacidad. Jiménez et al. (2012), observaron un descenso en la transparencia y brillo de films de almidón de maíz durante el almacenamiento atribuido al progreso de cristalización de la amilosa. La presencia de los aceites podría contribuir a limitar estos fenómenos de cristalización, dando lugar a films más transparentes.

IV.3.5. PROPIEDADES ANTIFÚNGICA

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no ha sido descrita claramente, aunque se ha correlacionado con su hidrofobicidad y en concreto con su composición en terpenos. La fracción terpénica, que es la mayoritaria en los aceites esenciales, tiene la habilidad de romper y penetrar en la estructura lipídica de la membrana celular de las bacterias, permitiendo la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de la membrana celular (Turina et al., 2006). La mayoría de los estudios señalan la gran efectividad de los aceites esenciales contra bacterias, y en concreto contra las Gram-positivas (Smith-Palmer et al., 2001) pero existen menos

estudios acerca de la actividad contra hongos. Los aceites esenciales de canela, clavo y orégano se han utilizado ampliamente en la formulación y aplicación de recubrimientos bioactivos para conservar alimentos muy diversos, siendo el de orégano el más utilizado (Sánchez-González et al., 2011).

En la Tabla IV.3.4 se muestran los resultados de la evaluación de la efectividad antifúngica de los films con aceites esenciales, a través del diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de los dos hongos *Fusarium oxysporum* (FOG) y *Colletotrichum Gloeosporioides* (CG), a las 48 horas y a las 72 horas de incubación. Este diámetro se midió desde el centro del film, de 24 mm, hacia el exterior de las placas Petri. Se utilizaron placas control (sin film) para comparar el crecimiento de los hongos. Los resultados en el control indicaron que a las 24 h había un crecimiento equivalente a 2/3 de la superficie de la placa. A las 72 h, toda la superficie quedó cubierta por el hongo.

Tabla IV.3.4. Halo de inhibición de crecimiento de *Fusarium oxysporum* (FOG) y *Colletotrichum Gloeosporiodes* (CG) a las 48 y 72 horas de incubación en contacto con la placa de los diferentes films. Valores medios, desviaciones y resultados del ANOVA.

FILMS	Halo de inhibición en el crecimiento del hongo (mm)			
	FOG a las 48 h	FOG a las 72 h	CG a las 48 h	CG a las 72 h
50S-50G-C	57(4) ^a	48(2) ^a	49(3) ^a	38(3) ^a
50S-50G-CI	49(2) ^b	46(2) ^a	52(2) ^a	45(2) ^b
50S-50G-O	42(3) ^c	36(2) ^b	41(7) ^b	30(7) ^c

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

Los resultados muestran que los tres aceites incorporados a los films fueron efectivos contra el crecimiento de los hongos. En general este efecto fue algo mayor en los films que incorporaban aceite esencial de canela contra *Fusarium oxysporum* (FOG). Los films que incorporaban AE de clavo y canela mostraron mayor actividad contra el hongo *Colletotrichum Gloeosporiodes* (CG). En cuanto a los films que contenían aceite esencial de orégano, la efectividad fue menor en comparación con los otros dos aceites. Los diferentes resultados obtenidos para los aceites están relacionados, entre otros factores,

con la naturaleza y composición de los mismos, cantidad de aceite esencial, proporción aceite/polímero en el film y las posibles interacciones entre los polímeros y los compuestos activos del aceite (Sánchez-González et al., 2011).

En los aceites esenciales de orégano, clavo y canela destacan como fenoles mayoritarios el eugenol, carvacrol y thymol (Sánchez-González et al., 2011). El eugenol, es muy abundante en los aceites de clavo (90%) y canela (60%), y principal componente volátil de estos aceites; mientras que en el orégano hay un alto porcentaje de carvacrol (50%) y de thymol (21%) (Santamarina y Rosello, 2013 datos no publicados). No obstante, diversos autores han demostrado que la actividad antimicrobiana total de los aceites esenciales no es únicamente atribuible a los componentes mayoritarios con actividad. Los aceites esenciales son una compleja mezcla de numerosas moléculas, y sus efectos biológicos son el resultado de la sinergia de todos sus componentes. Diversos estudios concluyeron que los aceites esenciales son más efectivos que sus compuestos aislados o las mezclas de sus componentes mayoritarios por el posible efecto sinérgico (Mourey y Canillac, 2002; Ranasinghe et al., 2002).

Lambert et al. (2001) encontraron una elevada efectividad antibacteriana de estos aceites y/o compuestos mayoritarios contra los patógenos de los alimentos. En cuanto al efecto antifúngico, diversos autores han descrito la efectividad de los aceites de canela, orégano y clavo para el control del crecimiento de diversos hongos,

mostrando su gran potencial en aplicaciones postcosecha o en la desinfección de semillas (García-Camarillo et al., 2006; Cueto et al., 2010. Rozwalka et al., 2010), encontraron en frutas de banano y guayaba un buen control de los conidios de los mohos *Colletotrichum Gloeosporioides* y el *Colletotrichum Musae* con los aceites esenciales de tomillo, palmarosa, clavo, canela y citronela. Barrera y García (2008) describieron la efectividad contra *Fusarium sp.* de los aceites esenciales tomillo, canela, clavo y epazote.

La incorporación de los aceites esenciales encapsulados en films permite mantener concentraciones altas de compuestos activos en las superficies donde se aplican (zonas de contaminación preferente), mediante la modulación de su cinética de liberación. El control de la difusión de los compuestos activos en la superficie del producto durante el almacenamiento será clave para conseguir el mejor control fúngico. En este sentido, y como ya se ha mencionado anteriormente, la naturaleza y cantidad de aceite esencial, la proporción aceite/polímero y las posibles interacciones entre los polímeros y los compuestos activos del aceite tendrán un papel determinante en la actividad antimicrobiana del film. Sánchez-González et al. (2011) concluyeron que cuando la actividad antimicrobiana del polímero es elevada, como en el caso del quitosano contra las bacterias Gram-negativa, la incorporación del aceite esencial reduce su actividad ya que disminuye la concentración efectiva del polímero. Sin embargo, la actividad

antimicrobiana del film se potencia con el aceite esencial cuando el polímero no tiene actividad. Ahmad et al. (2012) encontraron efectividad antibacteriana de aceites esenciales de bergamota y limón incorporadas a films de gelatina. Esta fue mayor contra bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) que contra Gram-negativas (*E. coli* y *S. typhimurium*). Estudios realizados por Pelissari et al. (2009) en matrices de almidón de yuca y quitosano con aceite esencial de orégano, mostraron también un gran efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) en comparación con las Gram-negativas (*S. enteritidis* y *E. coli*).

Numerosos estudios han demostrado la efectividad antibacteriana de diferentes films a base de aceites esenciales, pero se han encontrado pocas referencias de su efectividad contra hongos. La mayoría de estos estudios han demostrado su efectividad *in vitro*. Maqbool et al. (2011) comprobaron la mayor efectividad de aceites esenciales de canela y limón, incorporadas a films de goma arábica, contra los agentes causantes de la antracnosis (*C. musae* y *C. Gloeosporiodes*) en estudios *in vitro*. En aplicaciones sobre banana y papaya, encontraron una efectividad mayor al incorporar aceite de canela. También Souza et al. (2013) encontraron mayor efectividad contra hongos, presentes habitualmente en el pan, al incorporar aceite esencial de canela en films de almidón de yuca. Sánchez-González et al., 2010 encontraron actividad contra *Penicillium*

italicum en films de quitosano con aceites esenciales de árbol del té (Sánchez-González et al., 2010) y bergamota (Sánchez- González et al., 2011), en estudios *in vitro*. Otras investigaciones han mostrado la efectividad al aplicar aceites esenciales incorporados a films en el control de podredumbres comunes en naranjas (Plaza et al., 2004; Du Plooy et al., 2009; Cháfer et al., 2012) y papayas (Bosquez-Molina et al., 2010).

IV. CAPITULO 4

APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTOS ALMIDÓN-GELATINA CON ACEITES ESENCIALES EN LA CONSERVACIÓN DE PAPAYA

IV.4.1. CALIDAD DE PAPAYAS RECUBIERTAS

IV.4.1.1 Propiedades fisicoquímicas y pérdida de peso

La tabla IV.4.1 muestra los valores promedio de composición en sólidos solubles, humedad y acidez de las diferentes papayas a tiempo inicial y a los 7 días de almacenamiento. Los frutos utilizados mostraron variabilidad en los valores iniciales de estas variables, a pesar de la selección visual, lo que puede influir en la no detección de diferencias significativas claras debido al tratamiento. El contenido en sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) tuvo un valor promedio para todas las muestras y tiempos de 8,3. El contenido en agua osciló entre los valores promedio de 91,3 y 90,6 (g/100 g muestra), para el tiempo inicial y final, respectivamente. La acidez mostró, en general, una evolución significativa durante el almacenamiento disminuyendo de 0,18 g ácido cítrico/100g muestra (valor medio para todas las muestras a tiempo 0) 0,11-0,15, lo que es coherente con los cambios químicos característicos de la vida postcosecha de este tipo de frutas climatéricas, con independencia de que las muestras estén o no recubiertas.

Se han encontrado pocas referencias sobre la evolución de la calidad en papayas recubiertas. Estudios previos, encontraron un mayor efecto del recubrimiento sobre estas variables, en papayas recubiertas con quitosano (Asgar et al., 2010), goma arábica-aceites

esenciales (Maqbool et al., 2011) y aloe vera (Lakshmi et al., 2011). En todos los casos el recubrimiento consiguió frenar los cambios químicos relacionados con el avance de la maduración, pero las condiciones de almacenamiento fueron muy diferentes a las utilizadas en el presente estudio. Los periodos de almacenamiento fueron de 5 semanas a 12°C, seguidos de 5 días en condiciones ambiente (25-28°C y 60% de HR). En el estudio de Lakshmi et al. (2011) las condiciones fueron de 30° y 42-55% HR. Estas diferentes condiciones podrían explicar los mayores cambios químicos detectados, relacionados con el avance del proceso de maduración de la fruta. Además la diferente barrera a los gases de cada tipo recubrimiento también contribuye en diferente medida en la evolución de este proceso.

La figura IV.4.1 muestra las pérdidas de peso de las muestras a diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento. Se consideraron como control, frutas lavadas (desinfectadas con hipoclorito sódico y enjuagadas) y no lavadas (tal y como llegaron al laboratorio del centro de acopio). En general, se observó que todas las muestras perdieron peso de forma significativa en el período del ensayo. Estas pérdidas fueron mayores en las muestras no recubiertas en comparación con las recubiertas, tanto en las lavadas como en las no lavadas, y ambas presentaron una evolución similar. No se encontraron diferencias significativas por efecto del tipo de recubrimiento, lo que parece lógico ya que la proporción de aceite

esencial que se incorporó a la formulación fue la misma y tras el secado, existen pocas diferencias en cuanto al aceite que queda en cada recubrimiento (aproximadamente 4 mg por fruto).

Los datos de pérdida de peso se pudieron ajustar linealmente a dos rectas, con un alto valor del coeficiente de correlación.

Estos ajustes indican una velocidad de pérdida relativa de peso de $1,6 \text{ d}^{-1}$ para las muestras no recubiertas frente a $1,1 \text{ d}^{-1}$ para el conjunto de las muestras recubiertas. Estos resultados son coherentes con los descritos por otros autores al aplicar recubrimientos a frutas, y están relacionados con el efecto barrera al vapor de agua de los mismos (Asgar et al., 2010; Maqbool et al., 2011; Lakshmi et al., 2011).

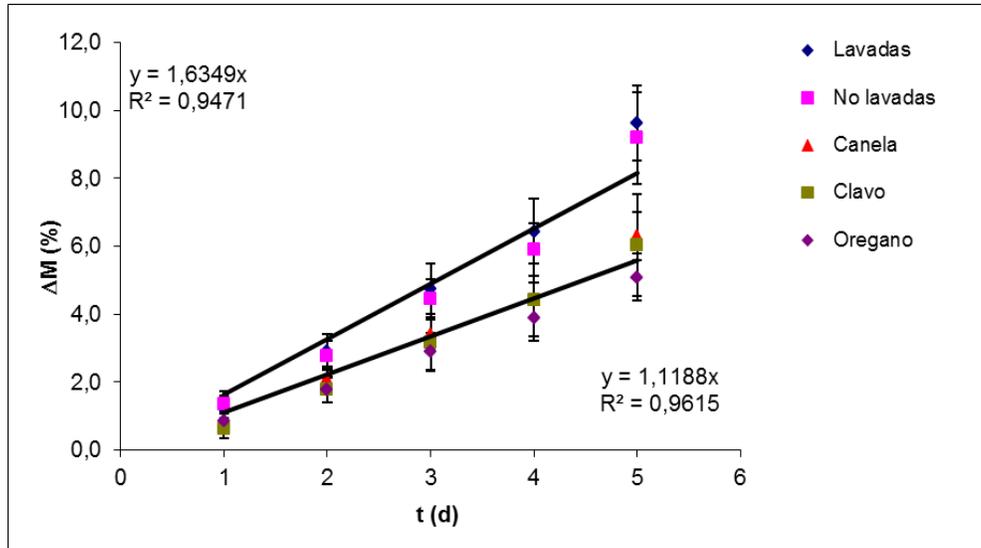


FIGURA IV.4.1. Pérdida de peso de las papayas no recubiertas (lavadas y no lavadas) y recubiertas con almidón-gelatina-aceites esenciales de canela, clavo y orégano, durante su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

TABLA IV.4.1. Composición en sólidos solubles, humedad y acidez de las papayas, recubiertas y no recubiertas, antes y después de su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR). Valores medios, desviación entre paréntesis y resultados del ANOVA.

MUESTRAS	° Brix		Humedad (%)		Acidez (g de ácido cítrico/100g muestra)	
	0 días	7 días	0 días	7 días	0 días	7 días
Control-sin recubrir	6,7(0,5) ^{(a)(x)}	7,3(0,2) ^{(a)(x)}	92,5(1,3) ^{(b)(x)}	92,6(0,5) ^{(c)(x)}	0,17(0,02) ^{(a)(x)}	0,13(0,02) ^{(b)(y)}
50S-50G-C	9,2(0,3) ^{(b)(x)}	9,21(0,08) ^{(b)(x)}	90,4(1,3) ^{(ab)(x)}	90,4(0,4) ^{(a)(x)}	0,19(0,02) ^{(b)(x)}	0,15(0,02) ^{(b)(y)}
50S-50G-CL	10,8(0,5) ^{(c)(x)}	9,3(0,2) ^{(b)(y)}	88,8(0,3) ^{(a)(x)}	90,6(0,5) ^{(a)(y)}	0,19(0,02) ^{(b)(x)}	0,14(0,02) ^{(b)(y)}
50S-50G-O	6,7(0,4) ^{(a)(x)}	7,5(0,4) ^{(a)(x)}	90,8(0,9) ^{(ab)(x)}	91,6(0,1) ^{(b)(x)}	0,16(0,02) ^{(a)(x)}	0,11(0,02) ^{(a)(y)}

a, b, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

IV.4.1.2. Color

La tabla IV.4.2 muestra los valores de las coordenadas CIEL^{*}a^{*}b^{*} de las diferentes muestras de papayas al principio y final del almacenamiento.

El ANOVA (Anexo 1) con los factores tiempo de almacenamiento y tratamiento revela un aumento significativo de la luminosidad (L^{*}) con el tiempo, pero sin efecto del tratamiento. A tiempo inicial no hay diferencias significativas entre las muestras, con valores de L^{*} que oscilan entre 50-57. A tiempo final las muestras no lavadas tuvieron una luminosidad (87) mayor en comparación con el resto de muestras que oscilaron entre valores de 72-76. Esto puede ser atribuido a la componente del brillo del fruto, diferente entre las muestras con la capa cerosa natural y las tratadas.

En la coordenada a^{*} tanto los factores (tratamiento y tipo de muestra) como la interacción tuvieron una influencia significativa. La coordenada a^{*} aumentó significativamente desde valores negativos (verde) a positivos (rojo) durante el almacenamiento debido a los cambios de coloración que sufre la fruta durante su maduración, con un efecto menos significativo del tratamiento. En la coordenada b^{*} sólo los dos factores (tratamiento y tipo de muestra) tuvieron una influencia significativa. El valor de b^{*} siguió la misma evolución, aumentó con el tiempo de almacenamiento en todas las muestras,

como es lógico por el avance de la maduración de la este tipo de frutas.

Es destacable que los tratamientos que muestran diferencias significativas respecto al resto son únicamente los tratamientos control (sin aplicación de recubrimientos): muestras no lavadas y lavadas. La evolución del color durante el almacenamiento es el asociado a la maduración con cambios de coloración del verde al amarillo y a colores más claros. En este sentido hay que destacar que todas las muestras llegaron al laboratorio a la vez y las que fueron analizadas primero fueron las no recubiertas. Por tanto las diferencias encontradas entre muestras recubiertas y no recubiertas podrían ser debidas únicamente al mayor grado de madurez de las muestras recubiertas en el momento de su análisis ya que las diferencias aparecen ya en el tiempo inicial. Desde este punto de vista, se puede asumir que los tratamientos con recubrimientos no provocan diferencias significativas en el color de las papayas. Esto es coherente con lo descrito anteriormente para los cambios químicos. En estudios previos, Lakshmi et al. (2011) observaron un efecto significativo de recubrimientos a base de *aloe vera* frenando el desarrollo del color en papayas durante su almacenamiento. Esto puede estar relacionado tanto con el diferente efecto barrera a los gases del recubrimiento como con las condiciones de almacenamiento. Lakshmi et al. (2011) utilizaron temperaturas y tiempos mayores (30°C, y 10-15 días) y HR más bajas (42-55%).

Tabla IV.4.2. Coordenadas de color de las papayas, recubiertas (RC) y no recubiertas, antes (0) y después de su almacenamiento (6 días) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR). Valores medios y resultados del ANOVA.

MUESTRAS	L*		a*		b*	
	0 días	6 días	0 días	6 días	0 días	6 días
No lavadas (NL)	57(5) ^{(a)(x)}	87(4) ^{(b)(y)}	-16(8) ^{(b)(x)}	12(9) ^{(b)(y)}	42(11) ^{(b)(X)}	79(3) ^{(b)(y)}
Lavadas (L)	52(7) ^{(a)(x)}	76(12) ^{(ab)(y)}	-18(5) ^{(b)(x)}	8,4(3) ^{(ab)(y)}	31(13) ^{(ab)(x)}	67(9) ^{(a)(y)}
RC con 50S-50G-C	57(16) ^{(a)(x)}	72(10) ^{(a)(y)}	-27(3) ^{(a)(x)}	14(9) ^{(b)(y)}	26(8) ^{(a)(x)}	62(6) ^{(a)(y)}
RC con 50S-50G-CL	50(4) ^{(a)(x)}	73(8) ^{(a)(y)}	-29(4) ^{(a)(x)}	9,2(0) ^{(ab)(y)}	22(7) ^{(a)(x)}	64(1) ^{(a)(y)}
RC con 50S-50G-O	51(3) ^{(a)(x)}	72(10) ^{(a)(y)}	-30(4) ^{(a)(x)}	2,2(5) ^{(a)(y)}	25(6) ^{(a)(x)}	63(4) ^{(a)(y)}

a, b, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$)

IV.4.1.3. Firmeza

La firmeza de la papaya se ha evaluado mediante la fuerza máxima del ensayo de punción, en muestras con y sin piel y en diferentes puntos a lo largo del meridiano de la fruta (desde el pedúnculo a la flor), distinguiéndose entre la zona central y los extremos. Las tablas IV.4.3 y IV.4.4 presentan los valores medios para cada tipo de muestra con diferentes tratamientos y tiempos de almacenamiento.

Papayas sin piel

Para las muestras sin piel, el ANOVA (Anexo 2) con los factores tiempo de almacenamiento, tratamiento y zona de la papaya, revela efectos significativos del tratamiento, pero también de las interacciones entre los diferentes factores lo que obliga a la comparación caso a caso. A los 7 días de almacenamiento no hubo diferencias significativas en la firmeza de las diferentes muestras, ni debidas al tratamiento ni a su posición en la papaya. Al tiempo inicial, las muestras de los extremos de la papaya control (sin recubrimiento) fueron más firmes que las de la zona central, pero no se observó este efecto en las muestras recubiertas, que en promedio fueron menos firmes que las del control (que se midieron a un menor tiempo de residencia en el laboratorio). Estos resultados indican de

nuevo que las diferencias asociadas al tratamiento pueden ser atribuidas al diferente avance de la maduración entre las muestras control medidas con anterioridad a las recubiertas. Las diferencias encontradas entre la firmeza de las zonas extremas y central en la papaya control, revelan el ablandamiento más rápido de la pulpa en los extremos del fruto durante la maduración de la papaya. No obstante, no puede concluirse que haya un efecto del recubrimiento sobre la evolución de la textura de la pulpa del fruto.

Tabla IV.4.3. Firmeza (N) de las papayas sin piel, recubiertas y no recubiertas (RC), antes y después de su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR). Valores medios y resultados del ANOVA en el extremo y centro de los frutos sin la piel.

MUESTRAS	Firmeza (N) (extremo)		Firmeza (N) (centro)	
	0 días	7 días	0 días	7 días
Control	22(7) ^{(a)(x)}	14(5) ^{(a)(y)}	12(7) ^{(a)(x)}	6,3(1,1) ^{(c)(y)}
RC con 50S-50G-C	13(4) ^{(b)(x)}	4(3) ^{(c)(y)}	8,3(1,3) ^{(b)(x)}	16(3) ^{(a)(y)}
RC con 50S-50G-CL	7(2) ^{(c)(x)}	9(4) ^{(b)(x)}	6,1(1,2) ^{(b)(x)}	7(3) ^{(c)(x)}
RC con 50S-50G-O	6(2) ^{(c)(x)}	7(3) ^{(bc)(x)}	5(2) ^{(b)(x)}	11(3) ^{(b)(y)}

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

Papayas con piel

Para las muestras con piel, el ANOVA (Anexo 3) revela un efecto significativo del tratamiento, tiempo y zona de la papaya, siendo el tiempo el de mayor influencia, seguido del tratamiento. No obstante, también son significativas las interacciones de los factores tiempo-zona de la fruta. La comparación de los datos con los intervalos LSD, revela que, a los 7 días de almacenamiento, no hay grandes diferencias debidas al tratamiento, aunque las muestras control presentan el mayor cambio, mientras que las recubiertas con el film con aceite de canela fueron las que menos cambiaron, con una firmeza promedio significativamente mayor que las control. Las medidas del centro del fruto muestran más firmeza que las de los extremos para las papayas control, y también para las recubiertas con film con aceite de canela. Estos resultados revelan que durante la maduración la piel de la papaya se ablanda más en los extremos que en el centro, probablemente debido a la menor dimensión característica en esta zona del fruto lo que la hace más sensible a la pérdida de agua con la consiguiente pérdida de turgor. No obstante, parece que es la evolución de la fruta debida al avance de la maduración, y no el tratamiento con recubrimientos, lo que causa en mayor medida los cambios observados. En ese sentido no se observa un efecto notable de los tratamientos en la conservación de la textura de la papaya, con la salvedad del recubrimiento con aceite

esencial de canela que parece proteger la firmeza de la piel en una mayor medida. Este efecto protector ha sido descrito por otros autores en papaya recubierta (Asgar et al., 2010; Lakshmi et al., 2011; Maqbool et al., 2011).

Tabla IV.4.4. Firmeza (N) de las papayas con piel, recubiertas y no recubiertas, antes y después de su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR). Valores medios y resultados del ANOVA en el extremo y centro de los frutos con la piel.

MUESTRAS	Firmeza (N) (extremo)		Firmeza (N) (centro)	
	0 días	7 días	0 días	7 días
Control	20(6) ^{(a)(x)}	4(2) ^{(b)(y)}	5(4) ^{(b)(x)}	4,4(0,6) ^{(b)(x)}
RC con 50S-50G-C	17(4) ^{(a)(x)}	14(4) ^{(a)(x)}	18(4) ^{(a)(x)}	4,3(0,4) ^{(b)(y)}
RC con 50S-50G-CL	8(3) ^{(b)(x)}	7(3) ^{(b)(x)}	7,3(1,2) ^{(b)(x)}	6,1(0,7) ^{(a)(x)}
RC con 50S-50G-O	8(2) ^{(b)(x)}	6(4) ^{(b)(x)}	7,2(1,1) ^{(b)(x)}	5(2) ^{(ab)(y)}

a, b, c, Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones diferentes para un mismo tiempo de almacenamiento. ($p < 0.05$).

x, y, Diferentes superíndices entre dos columnas indican diferencias significativas entre los diferentes tiempos de almacenamiento para una misma formulación. ($p < 0.05$).

IV.4.2. EFECTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS RECUBRIMIENTOS

Los ensayos de efectividad antifúngica se realizaron en las condiciones ambiente de laboratorio de Guayaquil (Ecuador) en el mes de enero (20°C y 90% de HR), y para los dos hongos del estudio, FOG y CG. La efectividad antifúngica de los recubrimientos de almidón-gelatina-aceite esencial (orégano, clavo y canela) se evaluó en frutos previamente infectados con cada uno de los hongos, en los que evoluciona la infección (incidencia de la enfermedad). Se consideraron también dos controles de muestras de papaya sin recubrir, en uno no se realizó ningún tratamiento (no lavadas) y en el otro un lavado con hipoclorito sódico como desinfectante (lavadas). Además, se consideró un tercer control que fueron papayas no inoculadas y no tratadas. En la figura IV.4.2 se muestran los resultados obtenidos para las papayas recubiertas y no recubiertas, previamente inoculadas con el hongo FOG y CG. Los resultados del control con las papayas no inoculadas y no tratadas fueron 0 de frutos afectados en los 7 días de control.

Los resultados de la figura IV.4.2 muestran que siempre las papayas no lavadas, es decir las que no recibieron ningún tratamiento, fueron las que menor % de frutos afectados obtuvieron tanto para el FOG como para el CG. Estos resultados indican que la fruta posee una protección natural. En concreto, tras el corte de la papaya las muestras están cubiertas con el látex natural de la fruta que tiene

propiedades antimicrobianas (Giordani et al., 1996). Este antimicrobiano se debe perder tras el lavado de la fruta. El lavado de las papayas con hipoclorito sódico demostró ser muy eficaz en el control del crecimiento del hongo, ya que tanto para el FOG como el CG, las muestras lavadas obtienen baja incidencia de la enfermedad (% de frutos afectados bajo) y siempre menor que al aplicar los recubrimientos.

Entre los recubrimientos aplicados, y para los 7 días del ensayo, en % de frutos afectados por FOG fue menor con los recubrimientos con aceite esencial de canela que con los que contenían clavo, en primer lugar, y orégano, en segundo lugar. Sólo en los dos primeros días de almacenamiento, fueron más efectivos los recubrimientos que el simple lavado con hipoclorito (muestras lavadas) y, en concreto, el más efectivo fue el recubrimiento con aceite esencial de orégano.

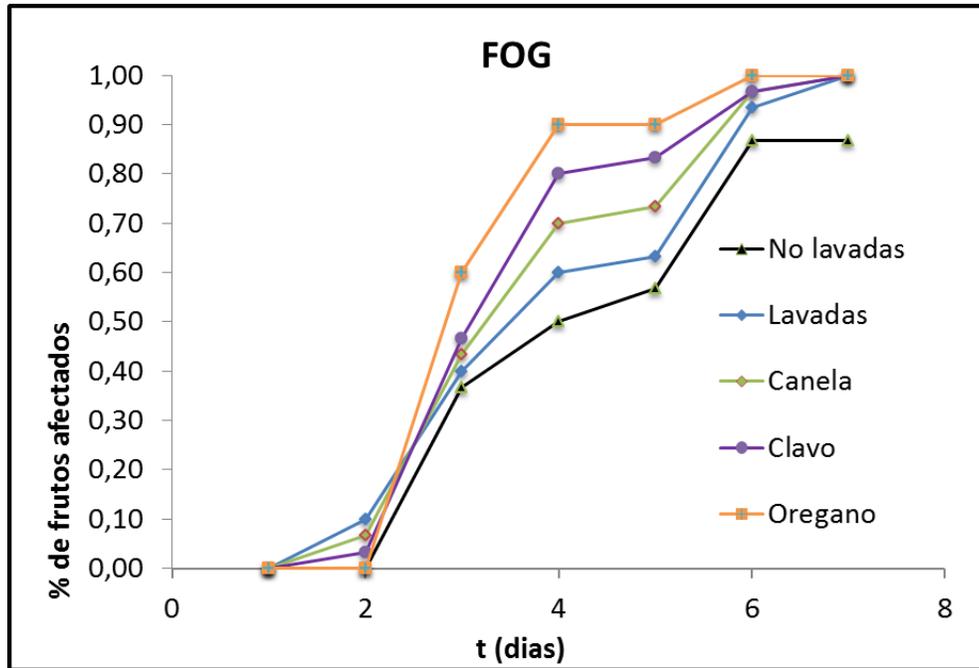


FIGURA IV.4. 2. Porcentaje de frutos afectados (incidencia de la enfermedad) por la infección con FOG y CG en papayas no recubiertas (lavadas y no lavadas) y recubiertas con almidón-gelatina-aceites esenciales de canela, clavo y orégano, durante su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

(Continua)

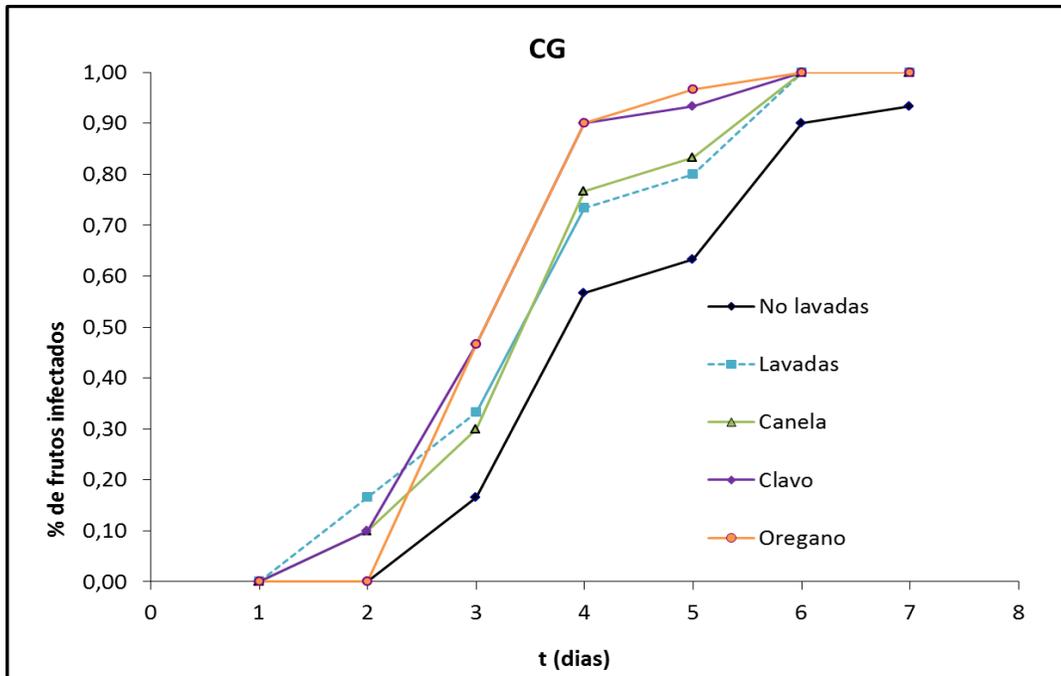


FIGURA IV.4. 2. Porcentaje de frutos afectados (incidencia de la enfermedad) por la infección con FOG y CG en papayas no recubiertas (lavadas y no lavadas) y recubiertas con almidón-gelatina-aceites esenciales de canela, clavo y orégano, durante su almacenamiento en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

Los resultados obtenidos en el control del CG siguieron tendencias similares a las descritas para el FOG aunque con algunos matices. En general, los recubrimientos evaluados mostraron mayor eficacia contra el CG que contra el FOG. Las muestras lavadas y recubiertas con AE de canela tuvieron resultados similares a lo largo del almacenamiento, y resultaron menos afectadas por la enfermedad que las recubiertas con AE de clavo y orégano. Estos dos últimos tratamientos evolucionaron de forma similar. De nuevo, hasta el día 2 de almacenamiento, el recubrimiento con AE de orégano mostró la mayor eficacia en comparación con las muestras lavadas y recubiertas con los otros AE. En el día 3 de almacenamiento, el recubrimiento que contenía AE de orégano perdió su eficacia y fueron los que contenían canela los más efectivos en comparación con las muestras lavadas, en primer lugar, y con las muestras recubiertas con los otros AE, en segundo lugar.

En general, los recubrimientos de almidón-gelatina-aceite esencial no mostraron efectividad en el control de la incidencia de la enfermedad causada por los dos hongos, y a pesar de que los ensayos realizados *in vitro* sí habían mostrado efectividad.

Maqbool et al. (2011) encontraron efectividad de aceites esenciales de canela y limón, incorporadas a de recubrimientos de goma arábica, contra los agentes causantes de la antracnosis (*C. musae* y *C. Gloeosporiodes*) en aplicaciones en banana y papaya. La

concentración óptima de aceite esencial de canela en las formulaciones para conseguir el control de la antracnosis (proporción de aceite: polímero 1:0,04) fue menor que la considerada en este estudio (proporción de aceite: polímero 1:0,25), lo que ratifica los resultados ya descritos en otros trabajos: a mayor concentración no hay mayor efecto antifúngico (Bosquez-Molina et al., 2010). La concentración de aceite esencial fue la misma utilizada en el estudio *in vitro* (Capítulo IV.3), pero no resultó ser efectiva en la aplicación, como también ha sido observado en numerosos trabajos previos con diferentes resultados entre los estudios *in vivo* e *in vitro* (Plaza et al., 2004). Otro aspecto clave a tener en cuenta, son las condiciones en las que se realizó la aplicación (20°C y 90% de HR). Las altas HR alargaron notablemente el tiempo necesario para el secado de los recubrimientos aplicados a las papayas. Esto pudo producir grandes pérdidas de aceite esencial de la matriz almidón-gelatina durante el secado con la pérdida de la efectividad antifúngica. Además estos polímeros son un excelente caldo de cultivo para el crecimiento de los hongos, lo que pudo aumentar la incidencia de la enfermedad cuando se aplicaron recubrimientos. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que en los ensayos preliminares de aplicación de estos recubrimientos con AE a papayas infectadas, y en las condiciones de laboratorio de Valencia en el mes de noviembre (20°C y 50% HR), sí se observó un efecto antifúngico de estos recubrimientos. Los tiempos de secado en este caso eran entorno a

las 2 horas, mientras que cuando la HR estaba en torno a 90%, se necesitó más de 1 día para el secado completo del recubrimiento. Esto explicaría que a tiempos cortos de almacenamiento, se observe un mayor efecto de los AE de los recubrimientos, y que además los de aceite de canela fueran más efectivos.

La mayor efectividad antifúngica del aceite esencial de canela, incorporado a matrices de almidón de yuca, ha sido también observada por Souza et al. (2013), contra hongos presentes habitualmente en el pan (*P. commune* y *E. amstelodami*). Otros aceites esenciales como el de tomillo y limón, incorporados a recubrimientos de goma mezquite (Bosquez-Molina et al., 2010), mostraron efectividad contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*. Otras investigaciones han mostrado también efectividad al aplicar aceites esenciales incorporados a recubrimientos, en el control de podredumbres comunes en naranjas (Plaza et al., 2004; Du Plooy et al., 2009; Cháfer et al., 2012).

En conclusión, son necesarios más estudios con un control del tiempo de secado del recubrimiento y la dosis de aceite esencial para evaluar la actividad antifúngica en frutos de papaya de los recubrimientos almidón-gelatina con aceites esenciales de corteza de canela, clavo y orégano.

V. CONCLUSIONES

CAPITULO IV.1

La incorporación de gelatina bovina a la matriz de almidón de yuca, en proporción almidón: gelatina de 1:1 y 3:1, y un lípido (mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos: E471) en proporción 1:0.15 polímero: lípido, afectó de forma notable a las propiedades físicas de los films. Las propiedades mecánicas de los films mixtos mejoraron significativamente respecto a las de los films de almidón. La incorporación de la gelatina dio lugar a una mayor dureza, resistencia a la fractura y extensibilidad, mientras que el lípido provocó una disminución de la dureza y resistencia mecánica, pero potenció la extensibilidad con contenidos en gelatina del 50%. La adición del lípido supuso un incremento en las propiedades de barrera al vapor agua pero disminuyó la permeabilidad al oxígeno, el brillo y la transparencia de los films. El envejecimiento de los films aumentó la dureza y resistencia a la fractura de los films, especialmente en los que no contienen lípido. No obstante, la presencia de lípido potenció la extensibilidad de los films durante el almacenamiento, especialmente en los films con solo almidón.

CAPITULO IV. 2

El análisis estructural de los films de almidón-gelatina, con o sin lípido, a través del estudio microscópico, calorimétrico y de difracción de rayos X, reveló una miscibilidad parcial de los polímeros de almidón y gelatina, con la coexistencia de dos fases poliméricas interpenetradas en los films mixtos: una rica en almidón con temperatura de transición vítrea (T_g) inferior a la del almidón puro y otra rica en gelatina con T_g superior a la de la gelatina pura. El lípido presentó una baja compatibilidad con la matriz polimérica, apareciendo como partículas dispersas de diferente tamaño, en especial en los films mixtos. En los films de almidón o gelatina pura, las partículas de lípido no se aprecian claramente, aunque se detecta rugosidad en la criofractura que denota la formación de discontinuidades en la matriz. La difracción de rayos X de los films sin lípido reveló la formación de estructuras predominantemente amorfas en los films de almidón y en los mixtos, aunque el grado de cristalinidad aumento en los films de gelatina con el tiempo de almacenamiento. El lípido en los films aparece cristalizado, según se deduce del termograma obtenido por DSC, aunque el espectro de rayos X reveló la formación de cristales muy pequeños en base a la anchura y baja intensidad de los picos. Las imágenes de AFM mostraron resultados coherentes con las propiedades mecánicas de

los films, reflejando la heterogeneidad estructural de los mismos a nivel superficial.

CAPITULO IV. 3

La incorporación de aceites esenciales de corteza de canela, clavo y orégano (proporción polímero: aceite esencial de 1:0,25) a films de almidón de yuca-gelatina en proporción 1:1, para impartirles carácter antifúngico, fue efectiva, obteniéndose una retención en el film seco del 35-45 % del aceite incorporado a la dispersión formadora de film. Los aceites incorporados aparecen como fase dispersa en la matriz polimérica por su falta de miscibilidad. Su presencia dio lugar a una reducción significativa de la permeabilidad al vapor de agua de los films de almidón-gelatina, una reducción del 17- 30 % de la permeabilidad al oxígeno, dependiendo del tipo de aceite, y un aumento de su transparencia, sin provocar efectos negativos en su comportamiento mecánico, aunque se redujo su brillo. Los films con los aceites esenciales presentaron una notable actividad antifúngica contra los dos hongos ensayados, especialmente el de aceite de canela contra *Fusarium oxysporum* y el de aceite de clavo contra *Colletotrichium gloeosporoides*.

CAPITULO IV.4

La aplicación de los recubrimientos de almidón-gelatina con aceites esenciales de canela, clavo y orégano no mostraron efectividad antifúngica en el control de las podredumbres causadas por *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichium gloeosporoides* en papayas. Los diferentes resultados *in vitro* en relación a los obtenidos *in vivo* podrían estar relacionados con las condiciones de secado en las que se realizó la aplicación. La alta humedad relativa ralentizó el secado de los recubrimientos, lo que podría haber ocasionado la pérdida de los principios activos de los aceites esenciales. Los recubrimientos mostraron un efecto barrera al vapor de agua, reduciendo las pérdidas de peso durante la postcosecha. En general, estos tratamientos no afectaron a los parámetros de calidad de las papayas recubiertas almacenadas, en concreto su composición en sólidos solubles, agua, acidez, propiedades mecánicas y evolución del color.

CONCLUSIÓN GENERAL

Del estudio se obtiene la conclusión general de que los films mixtos almidón-gelatina en proporción 1:1, con glicerol como plastificante, presentan propiedades físicas muy adecuadas para su uso como material de envase biodegradable, tanto las mecánicas como las de barrera. Por otro lado, la incorporación a esta mezcla polimérica de aceites esenciales comporta una mejora en las propiedades de barrera al vapor de agua y al oxígeno, además de conferirle carácter antimicrobiano. Por tanto, estas formulaciones serían las recomendadas para la obtención de materiales de envase biodegradables o recubrimientos bioactivos para su aplicación a alimentos. Sería de interés analizar la obtención de estos films por técnicas de termoformado, de mayor aplicación industrial, con la posterior aplicación del film bioactivos por extensión (film doble capa) para evitar la termo-degradación de los compuestos activos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta H., Villada H.S., Prieto P.A. (2007) Envejecimiento de almidones termoplásticos agrios de yuca y nativos de papa observados por microscopia de fuerza atómica. *Inf. Tecnol.* 17 (3) 71-78
- Ahmad M., Benjakul S., Prodpran T., Winarni Agustini T. (2012). Physico - mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28 (189-199)
- Alummoottil N. J., Subramoney N. M. Kakkikat N.R. (2007). Studies on the synthesis and properties of hydroxypropyl derivatives of cassava (*Manihot esculenta crantz*) starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87:1954-1972.
- Alves V.D., Mali s., Beleia A., Grossmann M.V. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *J. Food Eng.* 78, 941-946
- Andreucetti C., Calvalho R.A., Galicia-García T., Martínez-Bustos F., González-Núñez R., Grosso C.R.F. (2012). Functional properties of gelatin-based films containing *Yucca schottland* extract produced via casting, extrusion and blown extrusion processes: A preliminary study. *Journal of Food Engineering* 113 (33-40)
- Andreucetti C., Calvalho R.A., Galicia-Garcia T., Martinez-Bustos F., Grosso C.R.F. (2011). Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. *Journal of Food Engineering* 103 (129-136).
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E. y Nakayama, A. (1996). Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars and glycerol. Part 1. *Carbohydrate Polymers*, 31, 179–192.

- Arvanitoyannis I., (2002). Formation and properties of collagen and gelatin films and coating IN A. Gennadios ed. Protein- Based films and coating Boca Raton fl. USA: CRC Press LCC.
- Arinivasa O., Ramesh M., Kumar K., Tharanathan R. (2004). Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. Journal of Food Engineering 63: 79-85.
- Asgar A., Mahmud T. M.M., Kamaruzamana S., Yasmeen S. (2010). Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum Gloeosporiodes* Penz) of Eksotika II Papaya. International Journal of Food Science and Technology, 45, 2134-2140.
- ASME (1995). Surface texture, Surface roughness, waviness and lay. Standard Designation: ASME B46.1 New York, USA. An American National Standard.
- ASTM (1995). Standard test methods for water vapor transmission of material. Standard Designation: E 96-95 Annual book of American society for testing materials. West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM. (1995). Standard test method for specular gloss. Standard Designation: D523-89 Annual book of American society for testing materials, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM. (2002). Designation D882-46T. Standard method tensile properties of thin plastic sheeting EN: Annual book of American Standard Testing Methods.
- Atares L., Bonilla J., y Chiralt A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. Journal of Food Engineering 100, 678-687

- Avena R. J.- Bustillos, B. Chiou, C.W. Olsen, P.J. Bechtel, D.A. Olson and T.H.McHugh (2011), Gelation, Oxygen Permeability, and Mechanical Properties of Mammalian and Fish Gelatin films. *Journal of Food Science*. Vol. 76 Nr. 519-524.
- Averous L. y Boquillon N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. *Carbohydrate Polymer* 56:111-112
- Ávila-Sosa R., Hernández-Zamoran E., López-Mendoza I., Palou E., Jiménez MT., Nevarez-Morillon V.G., López-Malo A. (2010). Fungal Inactivation by Mexican orégano (*Lippia berlandieri* shauer) Essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *JFS. Food Microbiology and Safety* vol. 75, Nr. 3, 127.
- Badii F., Martinet C., Mitchell J.R., Farhat I.A. (2006) Enthalpy and mechanical relaxation of glassy gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 20 (879-884).
- Bhatnagar S. y Hanna M.A. (1994). Amylose-lipids complex formation during single-screw extrusion of various corn starches. *Cereal Chem.* 71(6): 582-582
- Baldwin EA. (1994). Edible coating for fresh fruits and vegetables, past, present and future. In. Krochta JM., Baldwin EA., Nispero- Carriedo MO. Editor. *Edible coating and films to improve food quality*. Technomic publishing CO. Inc. Lancaster-Baser- Switzerland. pp.25-64
- Baldwin P. (1995). Studies on the surface chemistry minor component composition and structure of granule starches. Thesis (Doctor on philosophy). The University of Nottingham. UK.

- Banker G.S. (1966). Film coating theory and practice. *J. Pharm Sci.* 55:81-89
- Bastio C. (2001). Global status of the production of biobased packaging materials. *Stach/Starke.* 53:351-355.
- Barrera L. y García L. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* Aislado de papaya. *Revista UDO Agrícola.* 8(1), 33-41.
- Bastio C. (1998). Properties and applications of Mater-Bi starch-based materials. *Polymer Degradation and Stability,* vol. 59 pages 263-272
- Benavides, C (2002). Quitina-Quitosana: los polímeros del futuro SENA-CDT-Regional Valle, Cali, p6-61
- Bello-Pérez A. (1995). Amilopectina. Caracterización molecular y funcional Irapuato, Guanajuato México. Tesis doctoral en ciencias biotecnologías de plantas. Centro de investigación y estudios avanzados del instituto politécnico nacional CINVESTAV-IPN
- Bergo P., Sobral P.J.A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids* vol. 21 (1285-1289).
- Bertan L.C., Tanada-Palmu P.S., Siani A.C., Grosso C.R.F. (2005). Effect of fatty acids and "Brazilian Elemi" on composite films base gelatin. *Food Hydrocolloids* 19, 73-82.
- Bigi A. Crojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubini K.. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 22: 763-8
- Bigi A., Panzavolta S., Rubini k. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* 25: 5675-5680.

- Biliaderis C.G., Juliano B.O. (1993). Thermal and mechanical properties of concentrated rice starch gels of varying composition. *Food Chemistry* 48, 243-250
- Bizot H., Bail Le., Leroux B., Davy J., Roger P., Buleon A., (1997). Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched poly-anhydroglucose compounds. *Carbohydrate Polymers*, 32(1), 33-50.
- Blacido D., Sobral P., y F.C. Menegalli (2005). Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering* 67: 215-223.
- Bonilla J., Atares L., Vargas M., Chiralt A. (2011). Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. *Procedia Food Science*. 1 (50-56)
- Bonilla J., Talon E., Atáres L., Vargas M., Chiralt A. (2013) Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch-chitosan films. *Journal of Food Engineering*. 118 (271-278).
- Bonilla J., Atáres L., Vargas M., Chiralt A. (2013). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*. 2013 (1-8).
- Bonilla J., Atáres L., Vargas M., Chiralt A., (2013). Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. *Journal of Food Engineering*. 114 (303-312).
- Bosquez-Molina E., Ronquillo-De Jesús E., Bautista-Baños S., Verde-Calvo J.R., Morales- López J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya

- fruit and their possible application in coating. *Postharvest Biology and Technology*. 57 (132-137).
- Brodos E. y otros 3 autores. (2007). Could biopolymers reinforced by randomly scattered flax fiber be used in structural applications *Comp. Sci Technol*. 67 (3-4) 462-470.
- Brodsky B. y Ramshaw J. (1997). The collagen triple-helix structure. *Matrix Biolo*. 15, 545-554.
- Callegarin, F., Gallo J.A., Debeaufort F., y Volilley A. (1997). Lipids and biopackaging. *Journal of the American Oil chemists Society*, 74 (10), 1183-1192.
- Campos C.A., y Gerschenson L.N. (2011). Development of Edible Films and Coating with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol*. 4:849-875.
- Cao, N., Fu, y He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1153e1162.
- Cho, S y Rhee C. (2002). Sorption Characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *Food Science and Technology* 35: 151-157.
- Cova A., Sandoval A.J., Balsamo V., Muller A.J. (2010). The effect of hydrophobic modifications on the adsorption isotherms of cassava starch. *Carbohydrate Polymers* 81 (660-667).
- Crapo C. y Bechtel P. (2003). Utilization of Alaska seafood processing by products in Bechtel. *Advances in seafood byproducts Conference Proceeding Fairbanks: Alaska Sea Grant College Program Univ. of AK*. P 105-19

- Cueto, M.C.; Rivas, C.; Alania, M.G.; Oranda, A.; Amaya, C.; Nuñez, A.; Samaniego, J.; Cano, P. (2010). Antifungal properties of essential oil Mexican oregano against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Revista Mexicana de Micología*, 31, (2-8).
- Cuq B., Gontard N., Guilbert S. (1998). Proteins Agricultural Polymers for Packaging Production. *Cereal Chem.* 75 (1) 1-9.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L. y Guilbert, S. (1997b). Select functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affect by hydrophilic plasticizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622–626.
- Cháfer M., Sánchez-González Ch., González-Martínez., Chiralt A. (2012). Fungal Decay and Shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and Tea Tree essential oils. *Journal of Food Science* vol. 77 (8) pp.182-187.
- Chambi, H., y Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458e466.
- Chang Y., Chea P., Seow C. (2000). Antiplasticization-plastization effect of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. *Journal of Food Science*. 65, pp. 445-451
- Chang Y.G. Abd Karim A., Seow C.C. (2006). Interactive plasticizing-antiplasticizing effects of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. *Food Hydrocolloids* 20 (1-8).
- Chaisawang M., y Supphantharika M., (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids* 20 (641-649).

- Charles A.L., Chang Y.H., Ko W.C., Sriroth K., Huang T.C. (2005). Influence of Amylopectin and Amylose content on the Gelling Properties of five cultivars of Cassava Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, (2717-2725).
- Chen, C.H. y Lai, L.S. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films in the presence of plasticizer. *Food Hydrocolloids*, 22, 1584–1595
- Chen C., kuo W., y Lai L. (2009). Rheological and physical characterization of film forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum. *Food Hydrocolloids* 23(8), 2132e2140
- Cheng Y., Tsai M., Tseng K. (1996). Effect of amylose content on the rheological property of rice starch. *Cereal Chemistry* v.73, n.4, pp 415-420.
- Chien, P.J, Sheu, F. Lin HR. (2005). Coating citrus (Murcot tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*. 100(3), 1160-1164.
- Chien-Hsien Chen, Wen-Shiuh Kuo, Lih-Shiuh Lai. (2009). Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum. *Food Hydrocolloids*, 23, 2132-2140.
- Chiou B., Avena-Bustillos R., Bechtel P., Imam S.H., Glenn G. M., Orts W.J. (2009). Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering*. 95 (327-331).
- Dai C.A., Chen Y.F. y Liu, M.W. (2006). Thermal properties measurements of renatured gelatin using conventional and temperature modulated

- differential scanning calorimetry. *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 1795–1801.
- Dranca I. y Vyazovkin S. (2009). Thermal stability of gelatin gels: effect of preparation conditions on the activation energy barrier to melting. *Polymer* 50, pages 4859-4867
- Debeaufort F. Gallo J.A., Delporte A., Voilley A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films *Journal of membrane Science*, 180. 47-55
- Debeaufort F., Quezada-Gallo J.A., Voilley A. (1998). Edible films and coating: tomorrow's packagings: a review. *Critical review in food science*, 38 (4), 299-313.
- Delville, J.C. Jolly, P. Dole, C. Bliard. (2003). Influence of photo crosslinking on the retrogradation of wheat starch based films. *Carbohydrate Polymers* 53 (373-381).
- Demecheli M., (2000) Biodegradable plastics from removable sources. www.jrc.es/pages/iptsreport/vol10/english/Env1E106.htm
- Dole, P., Jolly C., Espuche E., Alric I. Gontard N. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymer* 58: 335-343.
- Donhow I.G. y Fennema O. (1994). Edible films and coating: characteristics, formations, definitions and testing methods. In. *Edible coating and films to improve Food Quality Technomic Publishing Co. Lancaster PA.* pp. 1-24
- Donovan J.W., Mapes C.J. Davis J.G., y Garibaldi J.A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of Science Food and Agriculture*, 26, 73-83

- Du Plooy W., Regnier T., Combrinck S. (2009). Essential oil amended coating as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology* vol. 53(3) pp. 117-122.
- Durango A.M., Soares N de F., Arteaga M.R. (2009). Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol. 9 N° 1. (122-128).
- Eelinge R.C. y Delcour J.A. (1995). Formation analysis structure and properties of type III, enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science* V22 N° 22 pp. 129-138
- Emirglua Z.K., Yemisb, G.P. Coskunc, BK y Candoganb K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated the thm and egao essential oil on fresh ground beef patties. *Meat Science*. 86,
- Fabra M. J., Perez-Masia R., Talens P., Chiralt A. (2011). Influence of the homogenization conditions and lipid self-association on properties of sodium caseinate based containing oleic stearic acids. 25 (112-1121)
- Fabra M. J., Talens P. y Chiralt A. (2010a). Water sorption isotherms and phase transitions of sodium casein lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids*, 24, 384e391.
- Fabra M. J. Talens, P., Gavara R., Chiralt, A. (2012). Barrier properties of sodium caseinate films as affected by lipid composition and moisture content. *Journal of Food Engineering* 109 (372-379).
- Fama L., Rojas A., Goyanes S., Gerschenson L. (2003). Películas comestibles de aplicación industrial. *JORNADASSAM/CONAMET/SIMPOSIO MATERIA*. (898-901).

- Fama L., Flores S., Gershenson L., Goyanes S. (2006). Physical characterization of cassava starch biofilms with special reference to dynamic mechanical properties at low temperatures. *Carbohydrate Polymers* 66 (8-15).
- Fama L., Goyanes S. Gerschenson I. (2007). Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers* 70: (265-273)
- Fernández D., Rodríguez E., Bassas M., Viñas M., Solanas A., Llorens J., Marquéz A., Manresa A. (2005) Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain (*Pseudomonas Aerruginos*) NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering* 26(2-3): 159-167.
- Fisk C., Silver A., Bernadine C.S., Yanyung Z. (2008). Postharvest quality of Hardy kiwifruit (*Actinidia arguta ananasnaya*) Associated with packaging and storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 47, pages 338-345
- Flores S.K., Costa D., Yamashita F. (2010). Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. *Materials Science and Engineering. C.* 30 (196-202).
- Fonkwe L.G., Narsimhan G., Cha A.S. (2003). Characterization of gelatin time and texture of gelatin and gelatin polysaccharide mixed gels. *Food Hydrocolloids* 18, 717 e 726.
- Fornes, F., Almela, V; Abad, M; Agustí, M. (2005). Low concentrations of chitosan coating reduce water spot incidence and delay peel

- pigmentation of Clementine mandarine fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(7): 1105-1112.
- Forseell P.M. y otros 3 autores. (2002). Oxygen permeability of amylose and amylopectin film. *Carbohydrate Polym.* 47 (2) 125-129.
- Forsell P.M., Mikkila J., Moates G.K., Parker R. (1997). Phase and glass transition behavior of concentrated barley starch-glycerol-water mixtures, a model for thermoplastic starch. *Carbohydrate Polymers* 34, 275-282
- García M.A., Martino, M. N., y Zaritzky, N. E. (2000a). Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Starke*, 52, 118e124.
- García-Camarillo, E.A.; Quezada-Viay, J.; Moreno-Lara, J.; Sánchez - Hernández, G.; Moreno-Martínez, E.; Pérez-Reyes, C. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch). *Revista Mexicana de Fitopatología*. A.C. 24, 8-12.
- García M., Pinotti A., Martino M., Zaritzky N. (2004) Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymer* 56: 339-345,
- Gamagae S., Sivakumar D., Wijesundera R. (2004). Evaluation of post-harvest application of sodium bicarbonate-incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of anthracnose of papaya. *Crop Protection* 23(7): 575-579.
- Gaudin, S. y Lourdin D., Le Botlan D., Ilan J.L, Colonna O. (1999) Plasticization and mobility in starch-sorbitol films, *J. Cereal Sci*: 29 (3), 273–284

- Geraldine R. et al., (2008). Characterization and effect of edible coating on minimally processed garlic quality. *Carbohydrate Polymers*. 72, pp. 403-409
- Gennadios A.,Weller C.L. (1990). Edible films and coating from wheat and corn proteins *Food Technol*. 44:63-69
- Gennadios A.,Hanna M. y Kurth. (1997). Application of edible coating on meats poultry and sea foods. A Review *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30(4) pp.337-350
- Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., y Yarmand M.S. (2011). Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on keriran and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49 pp 378-384
- Giordani R., Cardenas ML., Moulin-Traffort J., Regli P. (1996). Fungicidal activity of latex sap from *Carica papaya* and antifungal effect of D(+) Glucosamine on *Candida Albicans* growth. *Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB), CNRS, Marseille, France Mycoses*. 39 (3-4): 103-110
- Golders Greta, Coesaert Hans, Delcour Jan. (2006). Amylose-Lipid complexes as controlled lipid release agents during starch gelatinization and pasting and food chemistry vol. 54 (4) pp. 1493-9.
- Gómez-Guillen M.C., Pérez-Mateos M., Gómez-Estaca J., López-Caballero E., Giménez B., Montero P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology* 20 (3-16)
- Gomand S.V., Lamberts I., Derbe L.J., Goesaert H., Vandeputte G.E., Goderin B., Visser R.G.F. (2010). Structural properties and

- gelatinization characteristics of potato and cassava starches and mutants thereof. *Food Hydrocolloids*. 24 (307-317)
- Gómez-Estaca J., Gómez-Guillen M.C, Fernández-Martin F., Montero P. (2011) Effects of gelatin origin bovine-hide and tuna –skin on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids* 25 (1461-1469)
- Gomez-Estaca J., Lopez de Lacery A., Lopez-Caballero M.E., Gomez-Guillen M.C., Montero P. (2010) Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oil as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*. 27 (889-896)
- Gomez-Estaca J. Montero P. Fernández-Martín F., Gomez-Guillen M.C.(2009) Physico-chemical and film forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *Journal of Food Engineering* 90(4) 480-486
- Gomez-Estaca J. Montero P. Gimenez B., y Gomez-Guillen M.C.(2007). Effect of functional edible films and high pressureprocessing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardine pilchardus*). *Food Chemistry*, 105 pp. 511-520
- Gontard N., Guilbert S., Cuq JL. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *J. Food Sci.* 58: 206-11
- Gou L., Liang Q., Du X. (2011). Effects of molecular characteristics of tea poly-saccharide in green tea on glass transitions of potato amylose, amylopectin and their mixture. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 4846-494.
- Guan J., y Hanna A.M. (2004). Extruding foams from corn starch acetate and native cornstarch. *Biomacromolecules* v.5, pp 2329-2330

- Gountard, N., Duchez C., Cuq J.L. y Guilbert S. (1994) Edible composite films of Wheat and lipid: water vapour permeability and other physical properties. *International Journal of food Science and Technology*, 29, 39-50.
- Guilbert, S., Gontard, N., y Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 29, 10 e 17
- Gujska E., Reinhard W.D., Khan K. (1994). Physicochemical properties of oat starches. *Food Research International*. Canada v.28 n, 1 pp 15-26
- Habitante, A.M.B.Q., Sobral, P. J. A., Carvalho, R. A., Solorza-Feria, J., Bergo, P.V.A. (2008). Phase transitions of cassava starch dispersions prepared with glycerol solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 93, 599–604.
- Hagenmaier R. (2005). A comparison of thane, ethylene and CO2 peel permeance for fruit with different coating. *Postharvest Biology and Technology* 37 (1) 56-64.
- Handenburg, RE., (1967). Wax and related coating for horticultural products A. bibliography. *Agricultural Research Service Bulletin*. 51-15 U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Hassan A.A. y Norziah M.H. (2012). Starch-gelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids* 26, 108-117.
- Hassan F., Murray B., Dickinson E. (2009). Microstructure and rheology of phase-separated gels of gelatin + oxidized starch. *Food Hydrocolloids*. 23 (1081-1088).

- Hassan F. y Rousseau D. (2013). Microstructure and elastic modulus of phase-separated gelatin+starch hydrogels containing dispersed oil droplets. *Food Hydrocolloids*. 30 (333-342).
- Hemeda HM., y Klein BP. (1990). Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Food Sci.* 55(1): 184-186
- Hernández-Izquierdo V.M., y Krochta J.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for films formation – a review. *Journal of food Science*, 73 (2), 30-39
- Hernández-Medina M., Torruco-Uco J., Chel-Guerrero L., Betancur-Ancona D., (2008) *Ciencia e Tecnología de Alimentos*. Campinas 28 (3): 718:726
- Hoque M.S. Benjakul S., y Prodpran T., (2010). Effect of heat treatment of film forming solution on the properties of film from cuttlefish (*sepia pharoonis*) skin gelatin. *Journal of food Engineering*, 96 (1), 66-73
- Hutchings, J. B. (1999). *Food color and appearance* (2nd Ed.). Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc.
- Iqbal M., Akbar J., Saghir S., Karim A., Koschella A., Heinze T., Sher M. (2011). Thermal studies of plant carbohydrate polymer hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 1775-1783
- Jenkins P.J. y Donald A.M. (1998). Gelatinization of starch: A combined sax/wax/dsc and sans study. *Carbohydrate research* Vol. 308 p, 133-147
- Jiménez A., Fabra M. J., Talens P. y Chiralt A. (2013). Phase transitions in starch based films containing fatty acids. Effect on water sorption and mechanical behavior. *Food Hydrocolloids*, 30 (408-418).

- Jiménez A., Fabra M. J., Talens P. y Chiralt A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropylmethylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 585e593.
- Jiménez A., Fabra MJ., Talens P., Chiralt A., (2012a) Edible and Biodegradable starch films: A review. *Food Bioprocess Technol.* DOI 10.1007/s11947-012-0835-4.
- Jiménez A., Fabra M.J., Talens P. Chiralt A. (2012b). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids* 26 (302-310).
- Jingyun D., Ruyi W., Bernandine C.S., Yanyun Z. (2011) Effect of edible coating on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 59 (71-79).
- Johnson N., Normand V., Clark A., Amici E. (2001). Interpenetrating network formation in agarose-sodium gellan gel composites. *Carbohydrate Polymer* 46: 383-39.. *Food Chemistry* 122 (1095-1101)
- Johnston-Banks, F.A. (1990), *Gelatin In Harris(ed), Food Gels* (pp 233-289) London.
- Kaynas K., Dardeniz A., y Seckin K. (2002) A research on determining the most suitable harvest maturity of the kiwifruits (actinidia Deliciosa cv. Hayward) Harvested at different time intervals. *Pakistan Journal of Applied Sciences* 2(12): 1074-1077

- Kaewtatip. K y Tanrattanakul V., (2008). Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. Carbohydrate polymers. Vol, 73 N° 4, PP 647-655
- Kanokrat L., Munehiko T., Kazufumi O. (2010). Characterization of gelatin-fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin Food Chemistry. 122 (1095-1101)
- Kechichian Viviane, Ditchfield Cynthia, Veiga-Santos Pricila, Tadini Carmen C., (2010). Natural Antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films. Food Science and Technology. 43 (1088-1094)
- Kester J.J., y Fennema O. (1986). Edible films and coating: A review. Food Technol. (40):47-59
- Kiatkamjornwong S., Sonsuk M., Wittayapichet S., Prasassarakich P. y Vejjanukroh P.C. (1999). Degradation of styrene-g-cassava starch filled polystyrene plastic. Polymer Degradation and Stability. Vol. 66, N° 3 pp. 323-335.
- Knutzon C.A. y Grove M.J. (1994). Rapid method for estimation of amylose in maize starches. Cereal Chemistry V, 71 N, 5 pp 469
- Koelsch, C.M., y Labuza, T. P. (1992). Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible barriers. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologies, 25, 404–411.
- Krochta JM. De Mulder-Jhonston (1997) Edible and biodegradable polymer films: challenger and opportunities Food Technol 51: 61-74p.
- Krochta, J. Baldwin E. y Nispero-Carriedo M. (1994). Edible coating and films to improve. Food Quality. Pennsylvania (USA). Technomic 379
- Kwang Y.L., Jaeyong S., Hyeon G.L. (2004) Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. Carbohydrate Polymers 56 (251-254)

- Lakshmi S.M., Abirami L.S.S., Pushkala r., Srividya. (2011). Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using Aloe Vera Based antimicrobial coating. *Indian Journal of Biotechnology* vol. 10, (83-89).
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas GJE. (2001). Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal Appl. Microbiol.* 91: 453-462
- Lawton, J. W. (1996). Effect of starch type on the properties of starch containing films. *Carbohydrate Polymers*, 29, 203–208.
- Lazaridou C., Biliaderis G., Kontogiorgos V., (2003) Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymer* 56: 251-254
- Ledward D.A., (1986). Gelation of gelatin in J. Mitchell & D.A. Ledward *Functional properties of food macromolecules* pp. 171-201 London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Lee, K. Y., Shim, J., y Lee, H. G. (2004). Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 251e254
- Leman J. y Kinsella J.E. (1989). Surface activity film formation and emulsifying properties of milk proteins. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 28 115-138.
- Linus Frankwe, Narsimhan Ganesan, Cha Alice. (2003). Food Hydrocolloides Characterization of gelatin time and texture of gelatin polysaccharide mixed gels. Vol. 17 (6), pp 871 -883.
- Letien C.Le., Letendre M., Ispas-Szabo P., Mateescu M.A., Delmas-Patteron G., Yu H.L. Lacroix M. (2000) Development of biodegradable

- films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *J. AGRIC. Food CHEM.* 48 (11), PP. 5566-5575
- Lopez-Rubio A., Almenar E., Hernandez-Muñoz P., (2004). Overview of active Polymer-Based Packaging Technologies for Food Applications. *Vol. 20 (4). Pag. 357-387*
- Lim T.L., Mine Y., Tung M.A., (1999). Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature and glycerol content. *L. Food Science* 64 (4) 616-22
- Lomeli R. M.G., Satyanarayana K., Iwakiri S. (2011). Study of the properties of biocomposites. Par I. Cassava starch-green coir fibers from Brazil. *Carbohydrate Polymers.* 1712-1722.
- Ma X., Yu J., Kennedy (2005). Studies on the properties of natural fibers-reinforced Thermoplastic starch composites. *Carbohydr. Polym.* 62 81)19-24.
- Mahdi S., Massoud R., Hadi S., Mohamad S. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, pages 162-166
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., y Zaritzky, N. E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *Journal of Food Engineering*, 75(4), 453e460.
- Mali, S., Sakanaka, L. S., Yamashita, F., y Grossmann, M. V. E. (2005). Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283–

- 289.starch products, *Journal of Applied Polymer Science*. 79, 2548-2557.
- Mc Hugh, T. H., Avena-Bustillos, R., y Krochta, J. M. (1993). Hydrophobic edible films: modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899e903.
- McHugh T.H. y Krochta J.M. (1994). Sorbitol vs glycerol- plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 42:841-845
- Maqboll M., Ali A., Alderson P.G., Mohamed M.T.M., Siddiqui Y., Zahid N. (2011). Postharvest application of gum Arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 62, (71-76).
- Matzinos P., et al. (2000). Processing and characterization of LDPE/
- Matsui K. N., Laratonda F.D.S., Paes S.S., Luiz D.B., Pires A.T.N., Laurindo J.B. (2004). Cassava bagasse-Kraft paper composite: analysis of influence of impregnation with starch acetate on tensile strength and water absorption properties. *Carbohydrate Polymers* 55 (237-243).
- Mehraj A., Soottawat B., Thummanoon Prodpran., Tri Winarni A. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*. 28 (189-199).
- Mehyar GF. Han JH. (2004). Physical and mechanical properties of high amylase-rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *J. Food Sci.* 69 E: 449-54

- Melo C.P.B., Grossmann M.V.E., Yamashita F., Youssef E.Y., Dall Antonia L. H., Mali S. (2011). Effect of manufacturing process and xanthan gum addition on the properties of cassava starch films. *J. Polym. Environ.* 19:739-749.
- Meneses J., Corrales C., Valencia M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista EIA*, ISSN 1794-1237 Numero 8, p.57-67.
- Min S.Y., y Krochta J.M. (2005). Wheat protein coating efficiency on mechanically roughened hydrophobic peanut surface. *Journal of science.* Vol. 71 (6). Pp 270 (6)
- Monedero F.M., Fabra M.J., Talens P., Chiralt A., (2009). Effect of calcium and sodium caseinatos on physical characteristics of soy protein isolate –lipid films. *Journal of Food Engineering.* vol. 9 (2). Pp 228-234.
- Morillon V., Debeaufort F., Blond G., Capelle M., y Voilley A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A Review *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 42, (1), 67-89.
- Mourey A. y Canillac N. (2002). Anti-listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control* Vol. 13 (4) pp. 289-292
- Moorthy S., (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches. *Starch/Starke* v.54 p. 559-592
- Myllarinen P., Partanen R., Seppala J., Forsell P. (2002). Effect of glicerol on behavior of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers.* Vol. 50 pages 355-361

- Navarro D., Díaz-Mula H.M., Guillen F., Zapata P., Castillo S., Serrano M., Valero D., Martínez-Romero D. (2011). Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus Stonifer*, *Botrytis cinérea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of food Microbiology* 151 (241-246).
- Nimitkeatkai H., Srilaong V., Kanlavanarat S. (2006). Effect of edible coating on pineapple fruit quality during cold storage. *ISHS. Acta Horticulturae* 712
- Novamont TPS for Industrial Non-Food uses (2007). www.biomatnet.org/segure/Other/S1281
- Novelo CL. y Betancur AD. (2005). Chemical and functional properties of phaseolus lunatus and manihot esculenta starch blends starch/starke v.57 n.9 pp 431-441
- Norman W.H. Cheetham, Leping Tao. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*. 277 – 284
- Oussalah M., Caillet S., Salmieri S., Saucier L., y Lacroix M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (18), 5598-5605
- Pagelle C., Spigno G., De Faveri D.M. (2002). Characterization of starch based edible coating. *Food and Bioproducts Processing* vol. 80 pages 193-198
- Park S.I., Stan S.D., Daeschel, M.A. y Zhao Y. (2005). Antifungal coating on fresh strawberries (*fragaria ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science* 70, 202-207

- Park H.J. (1999). Development of advanced edible coating for fruits. Trends in food Science and Technology, 10, 254-260
- Park J.W. Scott Whiteside, W., y Cho S.Y. (2008). Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat- pressed gelatin films LWT- Food Science and Technology, 41(4), 692-700
- Pareta R. y Edirisinghe M.J. (2006). A novel method for the preparation of starch films and coating. Carbohydr. Polym. 63(3), 425-431
- Parra D., Tadini C., Ponce P., Lugao A. (2004). Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. Carbohydrate Polymer 58: 475-481.
- Pastor C., Sánchez-González L., Marcilla A. Chiralt A. (2011) Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coating containing propolis extract. Postharvest Biology and Technology. 60:64-70
- Pastor C., Sánchez-González L., Chiralt A. Cháfer M., González-Martínez C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. Journal of Food Hydrocolloids 272,280.
- Plaza P., Torres r., Usall J., Lamarca N., Viñas I. (2004). Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 79 (6) 935-940.
- Pranoto, Y., Lee, C. M. y Park, H. J. (2007). Characterizations of fish gelatin films added with gellan and K-carrageenan. LWT e Food Science and Technology, 40(5), 766e774.

- Pelissari F., Grossmann M., Yamashita F., Pineda E. (2009). Journal of Agricultural and Food Chemistry. Antimicrobial, Mechanical and Barrier Properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. 57, 7499-7504. Antimicrobial activity. Food Hydrocolloids, 25(5), 1372-1381
- Pen L.T. y Jang Y.M. (2003). Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. LWT- Food Science and Technology, 36, pages 359-364
- Peredes M., Ponce A.G. Marcovich N.E., Ruseckaite R.A. y Martucci J.F. (2011). Chitosan –gelatin composites and bi-layer films with potencial
- Perdones A., Sánchez-González L., Chiralt A., Vargas M., (2012) Effect of chitosan-lemon essential oil coating on storage-keeping quality of strawberry. Postharvest Biology and Technology 70 (32-41)
- Perdones A., Vargas M., Atares L., Chiralt A. (2014) Physical antioxidant and microbial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. Food Hydrocolloids. 256-264
- Persico P., Ambrogi V., Carfagna C., Cerruti P., Ferrocino I., y Mauriello G. (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. Polymer Engineering e Science. 49(7), 1447-1455
- Perez-Gago MB. y Krochta JM. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. Journal of Agricultural and Food Chemistry vol. 49 (2) pp. 996-1002

- Pérez-Mateos M., Montero P., Gómez-Guillen M.C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*. 23 (53-61).
- Petersson M., y Standing. (2005). Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions *Food Hydrocolloids* 19(1), 123-132.
- Prodpran T., Benjakul S., Artharn A. (2007). Properties and microstructure of protein based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. *International JOURNAL OF Biological Macromolecules*. Vol. 41 pages 605-614.
- Pranoto Y., Salokhe V.M., y Rakshit S.K. (2005) Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International* 38(3), 267-272
- Ponce AG., Roura SI., Del Valle CE., Moreira MR., (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coating enriched with natural plants: in vitro and in vivo studies. *Postharvest Boil Technol.* 49: 294-300
- Pyla R., Kim T.J., Silva J.L., Jung Y.S. (2010). Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International Journal of Food Microbiology* 137, 154-160
- Quattara B. et al. (2000). Inhibition of surface spoilage bacterial processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62 pp. 139-148
- Quezada Gallo J.A., Debeaufort F., Callegarin F., Voilley A. (2000) Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties

- of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*. Vol 180 (1) pp. 37-46.
- Quintavalla S. y Vicini L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62, pp. 373-380
- Ramachadran G.X., Chandrasekharan R. (1968) Interchange hydrogen bonds via bouns water molecules in the collagen triple helix. *Biopolymers*, vol. 6 p. 1649-1658
- Ranasinghe, L.; Jayawardena, B.; y Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 208-211.
- Ratnayake W. y Jackson D.S. (2007). Anew into the gelatinization process of native starches 67, 511-529
- Rao M.A., (2007). Flow and functional models for rheological properties of fluid foods en: Barbosa-Canovas G.V. (ed), *Rheology of fluid and semisolid food*, Springer, New York, 27-58
- Reolon S.V.C., Marques P.L., Borges L.J., Menegalli F.C. (2013). Water vapor barrier and mechanical properties of starch films containing stearic acid. *Industrial Crops and Products* 41 (227-234).
- Rindlav-Westling A., Standing M., Hermansson A.M., Gatenholm P. (1998) Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amuylopectin films. *Carbohydrate Polymers* vol. 36, pages 217-224

- Rivero, M.A. García, A. Pinotti (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 369-375.
- Ríaz, M. N. (1999). Processing biodegradable packaging material from starches using extrusion technology. *Cereal Foods World*, 44, 705–709.
- Rojas-Grau M.A., Avena –Bustillos J., Olsen C., Friedman M., Henika P.R., Martin-Belloso O., Pan Z., McHugh T.H. (2007). Effect of plant essential oils and oil compounds on mechanical barrier and microbial properties of alginate- apple puree edible films. *J. Food Engineering* 81, 634-641
- Romero-Bastidas C., Bello-Perez L., Garcia M.A., Martino M.N., Solorza-Feria J., Zaritzky N.E. (2005). Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non –conventional sources of starches. *Carbohydrate Polymers*, 60 pages 235-244
- Ronda F., y Roos Y.H. (2008). Gelatinization and freeze-concentration effects on recrystallization in corn and potato starch gels. *Carbohydrate Research* 343 pp. 901-911
- Rosa D., Bardi M., Manchado L., D. Dias., L. Silva., Y. Kodama. (2010). *J. Therm Anal Calorim.* 102: 181-186.
- Ross-Murphy S.B. (1992). Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer* vol. 33, 2622-2627.
- Ross- Murphy S.B.. (1998) Reversible and irreversible biopolymer gels- structure and mechanical properties vol 102 pages 1534-1539
- Roussanova M.,Enrione J., Diaz-Calderon P., Taylor A.J., Ubbinkl J., Alam M.A. (2012). A nanostructure investigation of glassy gelatin oligomers: molecular organization and interactions with low

- molecular weight diluents. *New Journal of Physics*. 14. 035016 (18pp).
- Rozwalka L.C., Alves E., Carvalho do Amaral D. (2010). Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum Gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. *Interciencia* Vol. 35 N°. 12
- Ruiz A. G. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Ingeniería y Ciencia* ISSN 1794-9165. Vol. 2, N° 4 Pag. 5-28.
- Ruiz G., Montoya C., Paniagua M. (2009). Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. *Revista EIA* numero 12, P. 67-78
- Ryu S., Rhim J., Roh H., Kim S. (2002). Preparation and physical properties of zein-coated high-amylose corn starch film. *Food Science and Technology* 35:680-686.
- Salgado P., Schmidt V., Molina S., Mauri A., Laurindo J. (2008). Biodegradable foams based on cassava starch, sunflower proteins and cellulose fiber obtained by a baking process. *Journal of Food Engineering* 85 (435-443).
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., y Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105, 246e253.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., y Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98, 443e452.
- Sanchez T., Dupour D., Moreno I.X., Ceballos H. (2010). Comparison of pasting and stabilities of waxy and normal starches from potato, maize, and rice with those of a novel waxy cassava starch under

- thermal, chemical and mechanical stress. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 58, 5093-5099.
- Santamaria B.F., Sauri D.E., Espadas y Gil F., Díaz P.R., Larque S.A., Santamaria J.M.(2009) Postharvest ripening and maturity indices for maradol papaya. *Interciencia*, Vol., 34, Num., 8 pp: 583-588
- Shen, X.L.,Wu, J.M. Chen, Y. y Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate of chitosan. *Food Hydrocolloids* 24,285-290.
- Stading M., Rindlav-Westling A., Gatenholm O. (2001). Humidity-induced structural transitions in amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers* 45 (209-217).
- Sebranek JG., 2004. Analisis de la comparación de la material prima, EN. *Enciclopedia De Ciencias de la carne* W. Jenson C. y M. Devine Dikeman (eds) Elsevier Limited, Oxford Reino Unido.
- Seyed M.O., Masoud R., Seyed H.R., Seyed M.H.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry* 122 (161-166).
- Smith Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (2001). The potential application of plant essential oils natural food preservatives in soft cheese *Food Microbiology* Vol. 18 (4). Pp. 463-470
- Singh L., Singh N., Saxena S.K. (2002). Effect of fatty acids on the rheological properties or corn and potato starch. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 9-16.

- Sobral PJA., Menegalli FC., Hubinger MD., Roques MA., (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films *Food Hydrocoll.* 15:423-32
- Sothomvit R. y Krochta J.M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of b-lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering* 50(3), 149e155
- Sothomvit R. y Krochta J.M. (2005). Plasticizers in edible films and coating. In *Innovations in food packaging* J.H. Han (ED). Elsevier Academic Press, San Diego CA, PP 403-433.
- Souza A.C., Benze R., Ferrao E.S., Ditchfield C., Coelho AC.C.V., Tadini C.C. (2012) Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT-Food Science and Technology* 46 (110-117).
- Souza A.C., Goto G.E.O., Mainnardi J.A., Coelho A.C.V., Tadini C.C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil: Antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology.* (1-7).
- Srinivasa, P. R. Baskaran, M. Ramesh, K. H. Prashanth y R. Tharanathan. (2004). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *European Food Research and Technology* 215: 504-508.
- Su J.F., Huang Z., Yuan X.Y., Wang X.Y. y Lim. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Mallard reactions. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 145e153.

- Talja, R. A., Helen, H., Roos, Y. H., y Jouppila, K. (2007). Effect various polyols and contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 67, 288–295.
- Taravel M.N., y Domard A. (1995). Collagen and its interaction with chitosan 2. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 16 (11) 865-971.
- Tharanathan R., (2003). Biodegradable films and composite coating: past, present and future. *Critical Review in Food Science and Technology* 14:71-78
- Thomas H.D., Atwell W.A. (1998). Starches practical guides for the food industry. American association of cereal chemist pp 1-87|
- Tan I.E. y otros autores. (2004). Estimating the specific heat capacity of starch-water-glycerol systems as a function of temperature and compositions, *starch (starke)* 56 (1), 6-12
- Tangpasuthadol V., Pongchaisirikul N., Hoven V. (2003). Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein. *Carbohydrate Research* 338:937-942
- Trezza T.A., y Krochta J.M. (2001). The gloss of edible coating as affected by surfactants, lipids relative humidity and time. *Journal of Food Science* vol. 65 (4) pp 658(5).
- Tongdeesoontorn W., Mauer L.J., Wongruong S., Sriburi P., Rachtanapun P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch- based films. *Journal Chemistry Central*. 5:6
- Turina AV., Nolan MV., Zygadli J.A., Perillo M.A. (2006). Natural terpenes self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem* 122:101-113.

- Vachon C., D'Aprano, G.D., Lacroix M., y Letendre M. (2003). Effect of edible coating process and irradiation treatment of strawberry fragaria spp. On storage-keeping quality. *Journal of Food Science*, 68 (2), 608-612
- Van Soest J.J.G. y Essers P. (1997) Influence of amylose/amylopectin ratio on properties of extruded starch plastic sheets. *J. Macromol. SCI., Part. A: 34 (9)*, 1665-1686
- Van Soest J.J.G. y otros 3 autores (1996b). Changer in the mechanical properties of thermoplastic potato starch in relation with changer in B-type crystallinity. *Carbohydr. Polym* 29: (3) 225-232
- Vanin F.M., Sobral P.J.A., Menegalli F.C., Calvalho R.A. Habitante A.M.Q.B. (2005). Effect of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin -based films. *Food Hydrocolloids* 19: 899-907
- Vargas M., Pastor c., Chiralt A., McClements D.J., y González-Martínez C. (2008). Recent advances in edible coating for fresh and minimally processed fruits. *Critical Review in food Science and Nutrition* 48, 496-511
- Vargas M., Albors A., Chiralt A., González-Martínez (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 41 (2), 164-171
- Veiga-Santos P., Oliveira L.M., Cereda M.P., Scamparini A.R.P. (2007). Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch-gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. *Food Chemistry* 103 (255-262).

- Veis A. (1964). The macromolecular chemistry of gelatin. New York, London: Academic press
- Villada H., Acosta H., Velasco R. (2008). Investigación de almidones termoplásticos, precursores de productos biodegradables. Información Tecnológica vol. 19 N°2.
- Villada H. S, Acosta H.A., Velasco R.J. (2007). Biopolymers Naturals used in biodegradable packaging. Temas Agrarios. Vol. 12(2) Julio – Diciembre 2007 (5-13).
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., y Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. Food Hydrocolloids, 19(53e 61).
- Wen Ma., Chuan-He T., Shou-Wei Y., Xiao-Quan Y., Quin W., Fu L., Zi-Hao W. (2012). Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. Food Research International 49 (572-579).
- Wang Y., Rakotonirainy M., Papua W., (2003) Thermal behavior of Zeina-base biodegradable films. Starch/Starke 55: 25-29
- Wongsasulak S., Yoovidhya T., Bhumiratana S., Hongsprabhas., McClements D.J., Weiss J., (2006). Thermo-Mechanical properties of egg albumen-cassava starch composite films containing sunflower-oil droplets as influenced by moisture content. Food Research International 39 (277-284).
- Xing Z., Ren W., Sang-Ho., Seung-Taik L. (2011). Water effect on the interaction between amylose and amylopectin during retrogradation. . Carbohydrate Polymers. 1671-1674.

- Yakimets I., Paes SS. Wellner N., Smith A.C., Wilson R.H., Mitchell JR.(2007). Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. *Biomacromoleculares* vol. 8 (5) pp. 1710-1722
- Yakimets I., Wellner N., Smith A.C., Wilson R.H., Farhat I., Mitchell J.(2005). Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer* 46. 12577-12585.
- Yaman O., Y Bayoindirli L. (2002). Effect of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherry. *Unid. Technol.* 35: 46-150
- Yang, L. y Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, 33, 571–578.
- Zeng J., Guanglei L., Haiyan G., y Zhengang RU. (2011). Comparison of A and B starch granules from three wheat varieties. *Molecules* 16,10570-10591
- Zhai M., Kim T.J., Silva J.L., Jung Y.S. (2010). Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 85, 622-628
- Zhai L., Fevzi C.C., Cohen R.E., Rubner M. (2004). Stable superhydrophobic Coating from polyelectrolyte multilayers. *American Chemical Society* 4 (7) pp 1349-1353
- Zhang B., Huang Q., Luo F., Fu X. (2012). Structural characterization and digestibility of de branched high-amylose maize starch complexed with lauric acid. *Food Hydrocolloids*, 28 (1), 174-181.

- Zhong Y., y Li Y. (2011). Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starch/ascorbic acid films. *Carbohydrate Polymers*, 85, 662-628
- Zhou X., Wang R., Yoo S.h., Lim S.T. (2011). Water effect on the interaction between amylose and amylopectin during retrogradation. *Carbohydrate Polymers*. 86, 1671-1674.
- Zhao J., Wistler R.L. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carrier. *Food Technology*. V, 48. N.7 pp. (273-281).
- Zobel H.F. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. Article published on line Wiley-vch vol. 40 Issue 1, pag 1-7

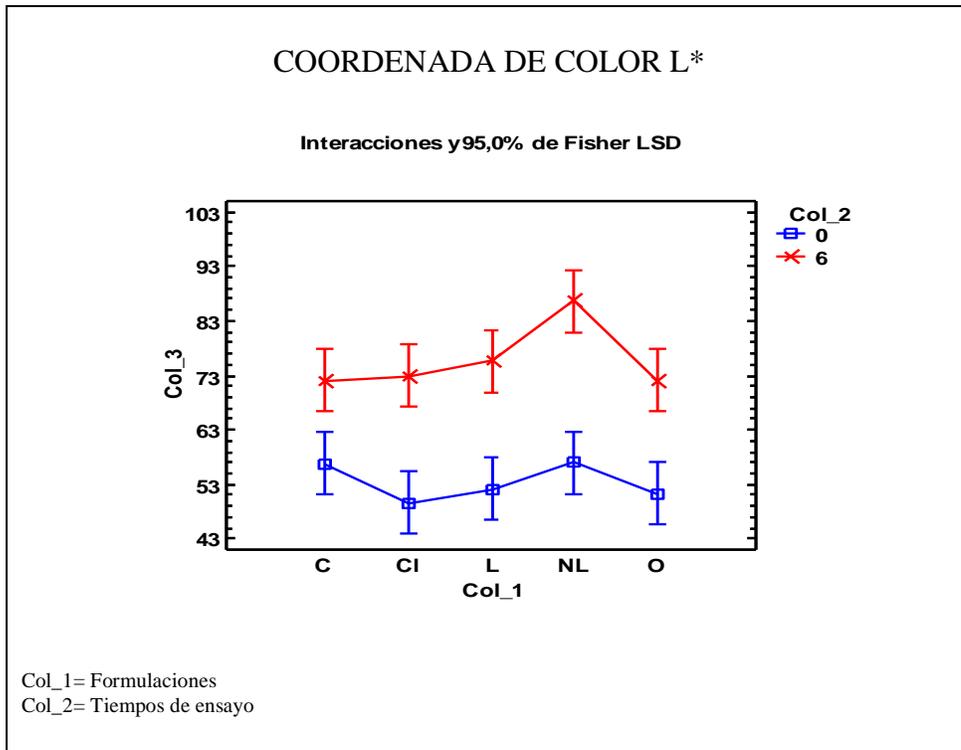
ANEXOS

ANEXO I

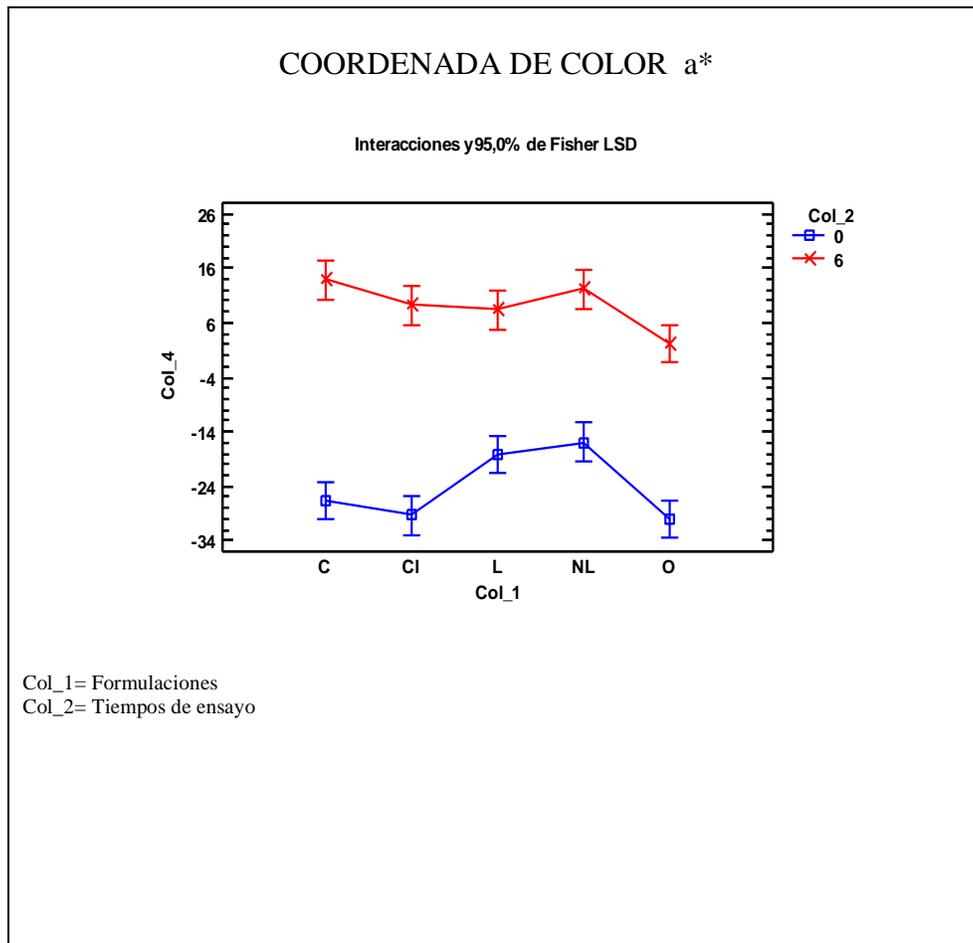
CAPITULO IV.4.1.2. COLOR

Tabla IV.4.2. Resultados del ANOVA de las coordenadas de color de las papayas, recubiertas (RC) y no recubiertas, antes (0) y después de su almacenamiento (6 días) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR) para un nivel de significación del 95%.

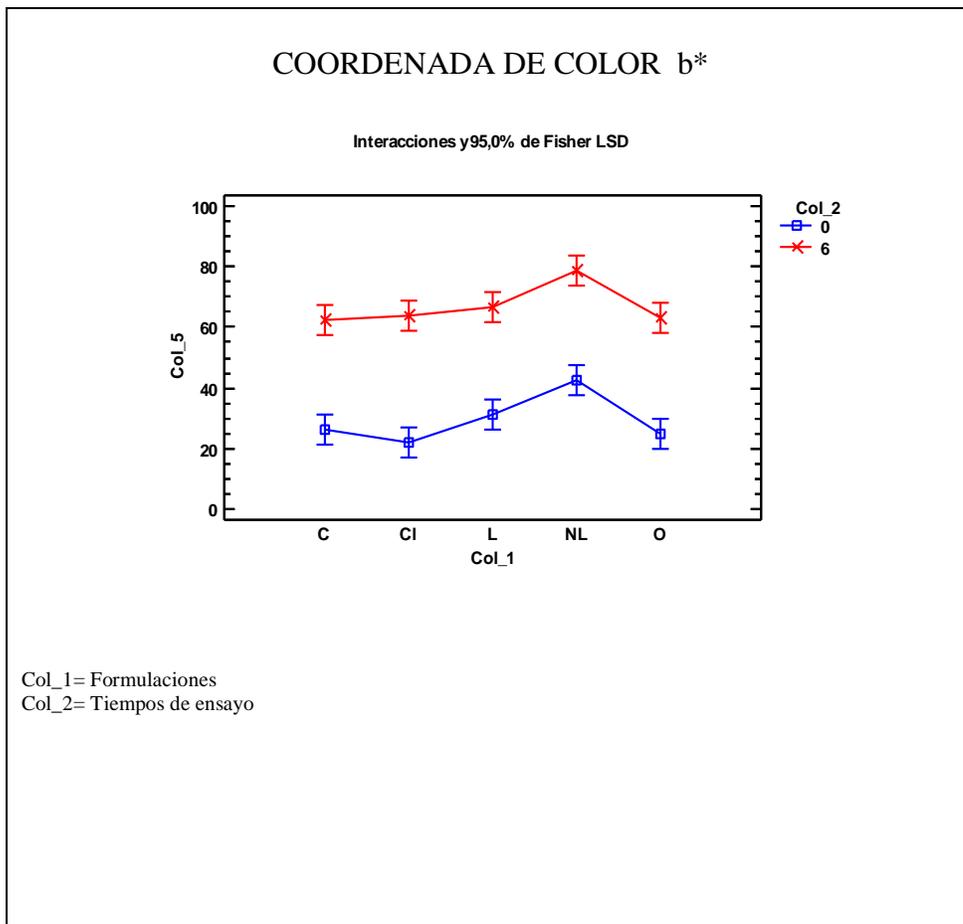
Factor	L* Valor p (95%)	a* Valor p (95%)	b* Valor p (95%)
Tratamiento	0,0781	0,0002	0
Tiempo	0	0	0
Interacción	0,5075	0,0265	0,9307



Grafica IV.4.1.2.1 Grafico de interacciones entre las formulaciones: lavadas (L), no lavadas (NL) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), a tiempo (0 y 6 días), para la coordenada de color L* en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).



Grafica IV.4.1.2.2. Gráfico de interacciones entre las formulaciones: lavadas (L), no lavadas (NL) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), a tiempo (0 y 6 días), para la coordenadas de color a* en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).



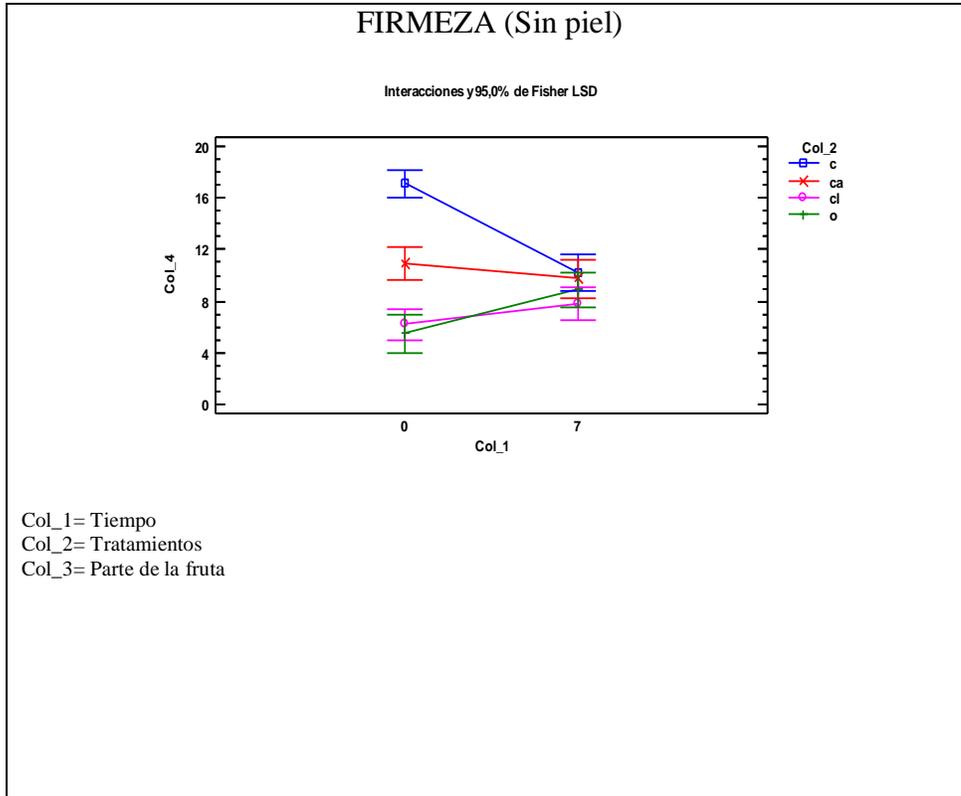
Grafica IV.4.1.2.3. Gráfico de interacciones entre las formulaciones: lavadas (L), no lavadas (NL) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), a tiempo (0 y 6 días), para la coordenadas de color a* en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

ANEXO 2

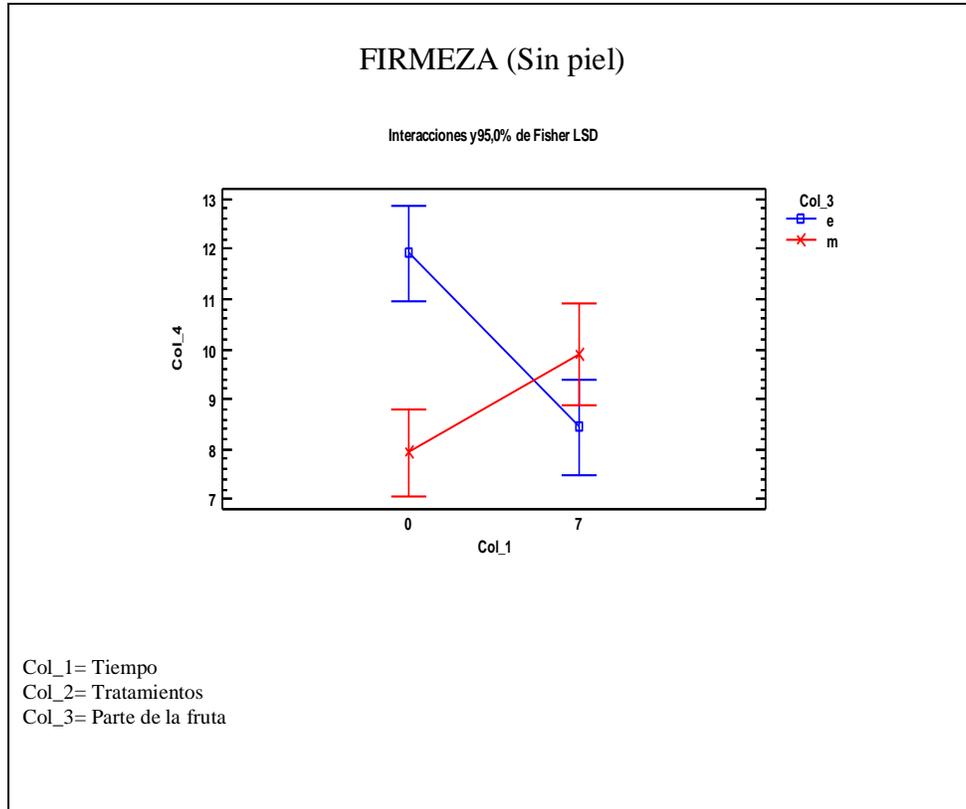
CAPITULO IV.4.1.3. FIRMEZA

Tabla IV.4.1.3.1 Resultados del ANOVA de la firmeza de las papayas sin piel y con piel, en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR) tomando como factores el tiempo (A) (0 y 7 días), tratamiento (B) (control, y con cobertura de canela, clavo, orégano), y parte de la fruta (C) (extremo y medio).

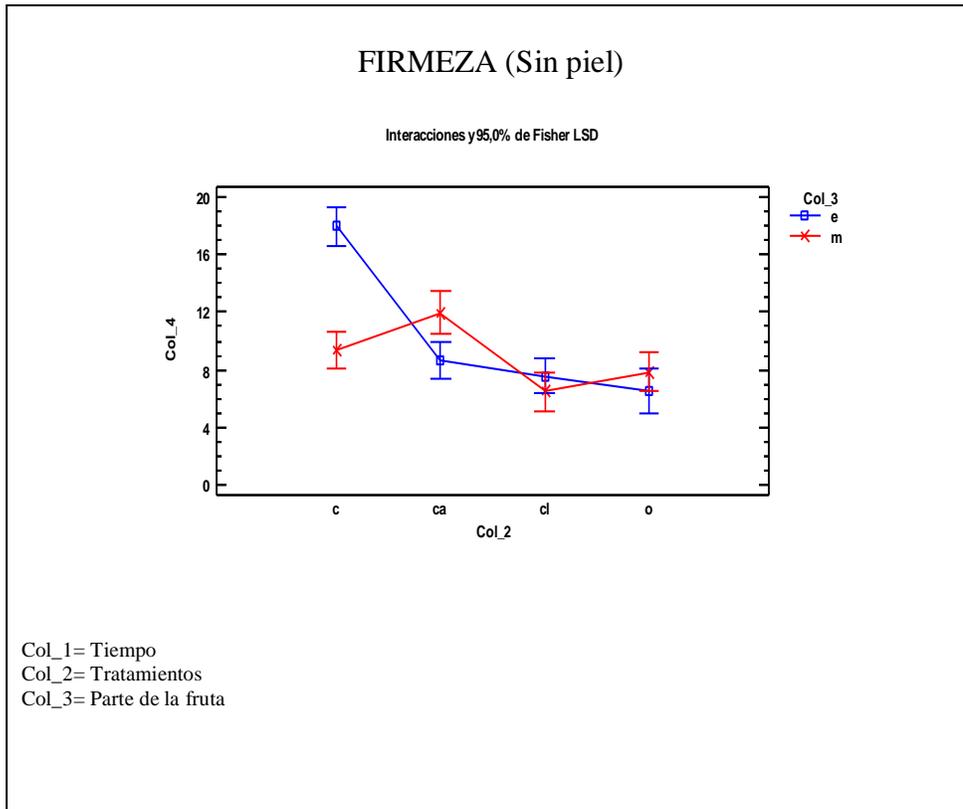
EFFECTOS PRINCIPALES	SIN PIEL Valor de p	CON PIEL Valor de p
A:tiempo	0,2647	0
B:tratamiento	0	0
C:parte de la fruta (extremo o centro)	0,0627	0,0007
INTERACCIONES		
AB	0	0
AC	0,0001	0,959
BC	0	0,0832
ABC	0	0,0003



IV.4.1.3.1.1. Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas sin piel, a dos tiempos (0 y 7 días), entre las formulaciones: control (C) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

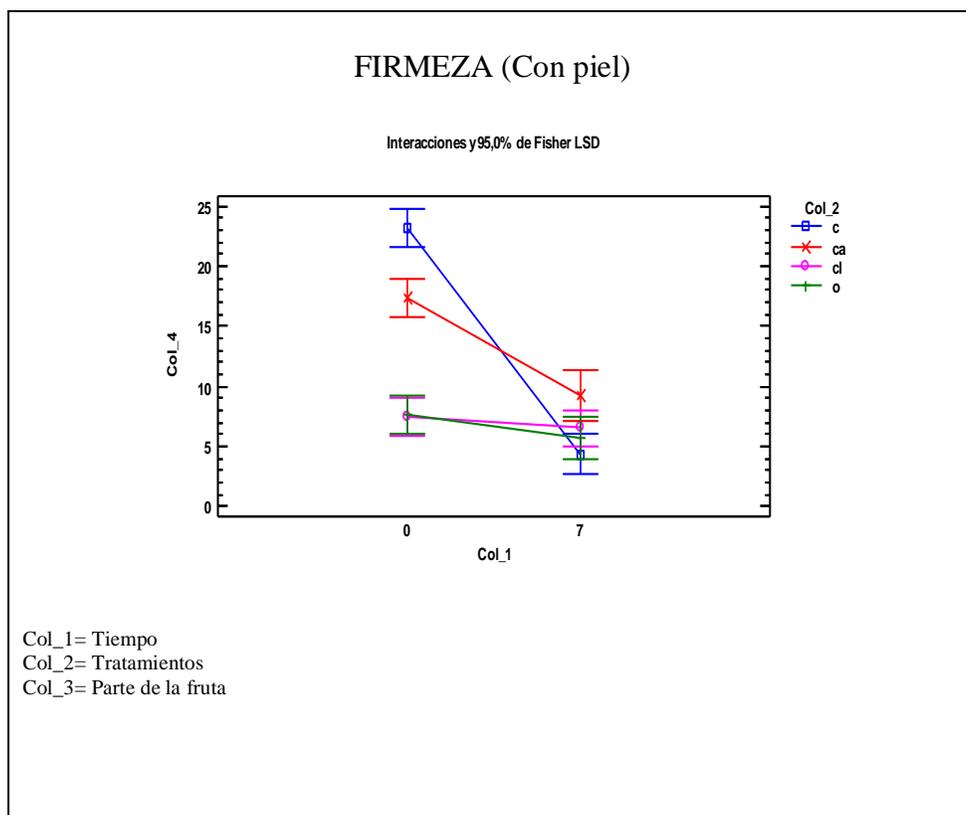


IV.4.1.3.1.2. Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas sin piel, a dos tiempos (0 y 7 días), entre las partes de la fruta (e=extremo, m=medio) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

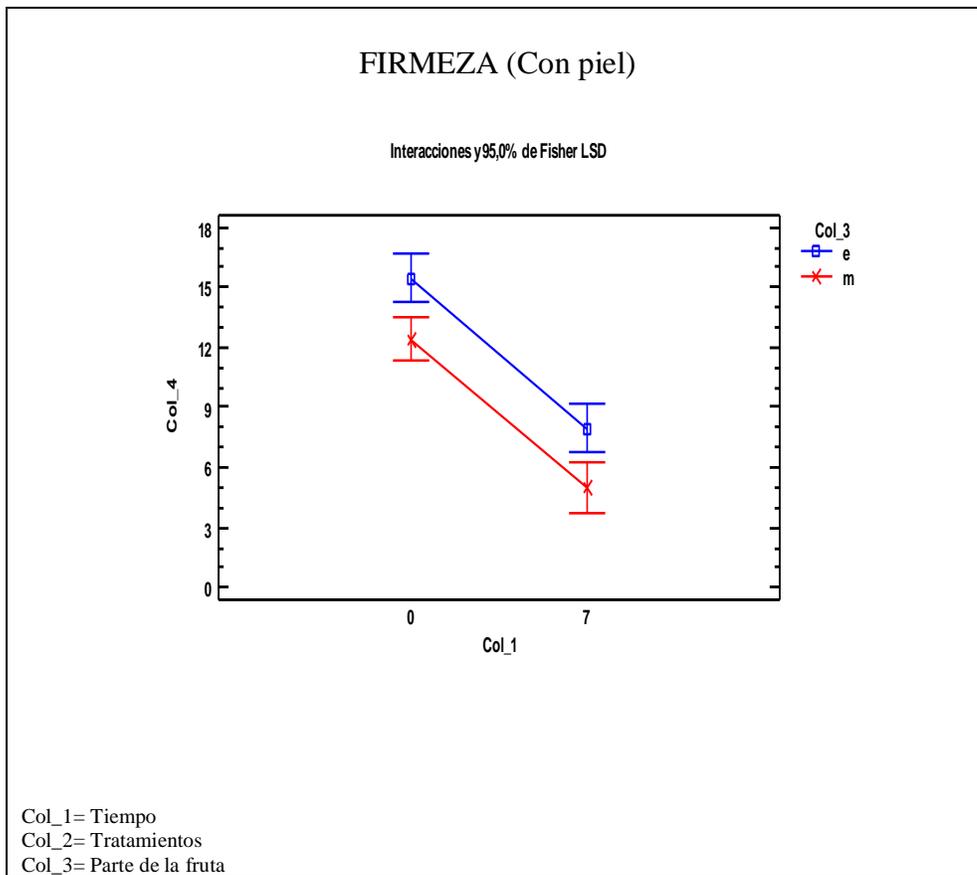


IV.4.1.3.1.3. Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas sin piel, entre las formulaciones: control (C) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), y las partes de la fruta (e=extremo, m=medio) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).

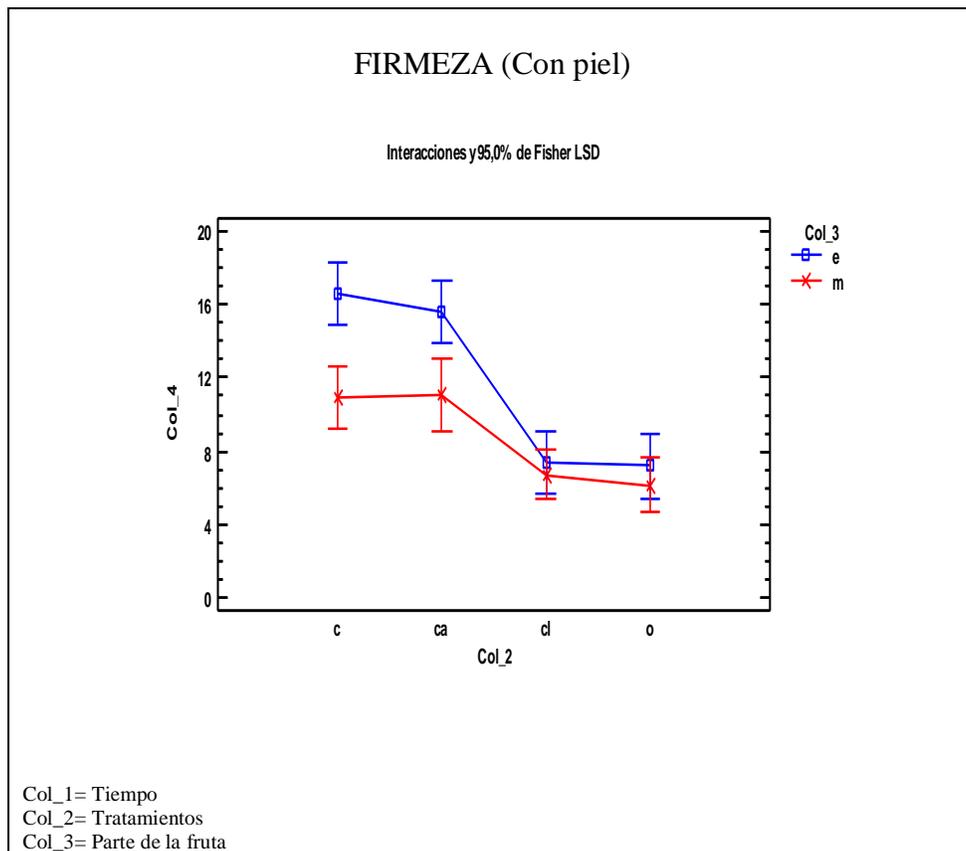
ANEXO 3
FIRMEZA
CAPITULO IV.4.1.3 PAPAYAS CON PIEL



IV.4.1.3.2.1 Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas con piel, a dos tiempos (0 y 7 días), entre las formulaciones: control (C) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).



IV.4.1.3.2.2. Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas con piel, a dos tiempos (0 y 7 días), entre las partes de la fruta (e=extremo, m=medio) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).



IV.4.1.3.2.3 Grafica de Interacción de la firmeza de las papayas con piel, entre las formulaciones: control (C) y recubiertas con canela (C), clavo (CL) y orégano (O), y las partes de la fruta (e=extremo, m=medio) en condiciones ambiente (20°C y 90% de HR).