

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO EN LA VIABILIDAD DE AGENTES DE BIOCONTROL INCORPORADOS EN PELÍCULAS BIODEGRADABLES

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Laura Espí Tomás

DIRECTORAS: Lorena Atarés Huerta y Maite Cháfer Nácher

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Anna Marín Gozalbo

Curso Académico:

2014-2015

VALENCIA, 2015



Resumen

El control biológico es una de las alternativas más eficientes y prácticas a los fungicidas químicos para el control de enfermedades producidas por hongos en agricultura. Su aplicación práctica no ha tenido lugar en gran medida por la sensibilidad de los agentes de biocontrol (ABCs) a condiciones ambientales adversas, que dan lugar a variabilidad y poca reproducibilidad en los resultados. Se ha trabajado con el ABC *Candida sake*, una levadura efectiva en el control de enfermedades postcosecha, así como de podredumbres de campo. Se seleccionaron ingredientes formadores de recubrimiento compatibles con este ABC. En concreto dos tipos de polímeros: el almidón de maíz (AM) y el caseinato sódico (NaCas). Para conseguir mejorar la adherencia del ABC en condiciones de aplicación, se incorporaron a las formulaciones tres tensoactivos de diferente hidrofobicidad (ácido oleico, Span 80 y Tween 85). Se obtuvieron películas y se caracterizaron sus propiedades físicas más relevantes. Después se formularon conjuntamente y se caracterizó la viabilidad del ABC tras el secado de las películas y a diferentes tiempos de almacenamiento en condiciones controladas (25°C, HR de 53 y 68%). Para entender mejor los resultados obtenidos, se analizó la microestructura de las películas por microscopía óptica. Los resultados muestran que las películas de NaCas tuvieron peores propiedades barrera tanto al vapor de agua como al oxígeno, coherentemente con una estructura más abierta y heterogénea, en comparación con el AM. NaCas supuso un soporte más adecuado para favorecer la viabilidad de *Candida sake*, tanto inmediatamente después del secado como durante el almacenamiento en condiciones controladas, probablemente debido al mayor poder nutritivo de esta matriz. La viabilidad del ABC durante el almacenamiento se vio favorecida por la menor HR, lo que sugiere la supervivencia del antagonista en un estado latente con una baja disponibilidad de agua. Las observaciones microscópicas corroboraron las diferencias encontradas en las propiedades físicas de las películas.

Palabras clave:

Agente de biocontrol, antagonista, *Candida sake*, almidón de maíz, caseinato sódico

Resum

El control biològic és una de les alternatives més eficients i pràctiques als fungicides químics per al control de malalties produïdes per fongs en agricultura. La seua aplicació pràctica no ha tingut lloc en gran mesura per la sensibilitat dels agents de biocontrol (ABCs) a condicions ambientals adverses, que donen lloc a variabilitat i poca reproductibilitat en els resultats. S'ha treballat amb l'ABC *Candida sake*, un llevat efectiu en el control de malalties postcollita, així com podridures de camp. Es varen seleccionar ingredients formadors de recobriments compatibles amb aquest ABC. En concret dos tipus de polímers: el midó de dacsca (AM) i el caseinat sòdic (NaCas). Per a aconseguir millorar l'adherència de l'ABC en condicions d'aplicació, es varen incorporar a les formulacions tres tensoactius de diferent hidrofobicitat (àcid oleic, Span 80 y Tween 85). Es varen obtenir pel·lícules y es varen caracteritzar les seues propietats físiques més rellevants. Després es varen formular conjuntament y es va caracteritzar la viabilitat del ABC després de l'assecat de les pel·lícules y a diferents temps d'emmagatzematge en condicions controlades (25°C, HR de 53 y 68%). Per a entendre millor els resultats obtinguts, es va analitzar la microestructura de les pel·lícules per microscopia òptica. Els resultats mostren que les pel·lícules de NaCas varen tindre pitjors propietats barrera tant al vapor d'aigua com a l'oxigen, coherentment amb una estructura més oberta i heterogènia, en comparació amb l'AM. NaCas va suposar un suport més adequat per a afavorir la viabilitat de *Candida sake*, tant immediatament després de l'assecat com durant l'emmagatzematge en condicions controlades, probablement degut al major poder nutritiu de la matriu. La viabilitat del ABC durant l'emmagatzematge es va veure afavorida per la menor HR, el que suggereix la supervivència de l'antagonista en un estat latent amb una baixa disponibilitat d'aigua. Les observacions microscòpiques varen corroborar les diferències trobades en les propietats físiques de les pel·lícules.

Paraules clau:

Agent de biocontrol, antagonista, *Candida sake*, midó de dacsa, caseinat sódic

Abstract

Biological control is one of the most efficient and practical alternatives to chemical fungicides to control fungal diseases in agriculture. Its practical application has not happened largely because of the sensitivity of the biological control agents (ABCs) to adverse environmental conditions, which results in poor reproducibility and variability in results. The ABC chosen was *Candida sake*, effective yeast in controlling postharvest diseases, as well as field rots. Film forming ingredients were chosen according to its compatibility with this ABC. Specifically, two types of polymers: corn starch (AM) and sodium caseinate (NaCas). In order to improve the adherence of the ABC in application conditions, three different surfactants with different hidophobicity were added into the formulations (oleic acid, Span 80 and Tween 85). Films were obtained and their most relevant physical properties were characterized. After, they were formulated together, and viability of the ABC was characterised after drying and during different storage times in controlled storage conditions (25°C, 53 and 68% HR). In order to understand better the results obtained, the microstructure of the film was analyzed by optical microscopy. The results showed that NaCas films had worse barrier properties to both water vapour and oxygen, coherently with a more open and heterogeneous structure, in comparison with AM. NaCas meant a more suitable carrier to promote *Candida sake* viability, both immediately after drying and during storage under controlled storage conditions, probably due to the greater nutritive value of this matrix. ABCs viability during storage was favoured by a lower HR, which suggests the survival of the antagonist in latency with low water availability. Microscopic observations corroborated the differences found between the physical properties of the films.

Key words:

Biocontrol agent, antagonist, *Candida sake*, corn starch, sodium caseinate

Agradecer en primer lugar a Lorena y Maite por darme la oportunidad de realizar este proyecto. En especial a Anna, por su esfuerzo, ayuda y paciencia en todo momento; porque sin ella este trabajo no habría sido posible. También a Víctor, por amenizar las horas de trabajo, y por su compañerismo.

*A mis padres por formarme como persona, y por luchar por mi mejor futuro cada día.
A mi hermana y mi tía por ser los mejores ejemplos a seguir.*

*A Giannis, porque puede que la distancia separe cuerpos,
pero no corazones; gracias por ser mi mayor apoyo.*

*A mis amigos, tanto a los que siempre han estado ahí, como a los que aparecieron en
mi vida hace cuatro años y se volvieron imprescindibles.*

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos	5
3. Materiales y métodos	7
3.1. Preparación de las dispersiones formadoras de películas	7
3.2. Caracterización de las películas	7
3.2.1. Contenido en humedad.....	8
3.2.2. Espesor	8
3.2.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	8
3.2.4. Permeabilidad al oxígeno (PO).....	9
3.3. Viabilidad de <i>Candida sake</i> incorporada en las películas.....	9
3.3.1. Preparación del inóculo de <i>Candida sake</i>	9
3.3.2. Inoculación de las DFP y obtención de las películas	10
3.3.3. Análisis de viabilidad de <i>Candida sake</i> en las películas	10
3.4. Microestructura de las películas con <i>Candida sake</i>	11
3.5. Análisis estadístico.....	11
4. Resultados y discusión	12
4.1. Caracterización de las películas	12
4.1.1. Humedad.....	12
4.1.2. Espesor	13
4.1.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	13
4.1.4. Permeabilidad al oxígeno (PO).....	14
4.2. Viabilidad de <i>Candida sake</i> incorporada en las películas.....	14
4.2.1. Efecto de la etapa de secado de las películas	14

4.3. Propiedades estructurales	20
5. Conclusiones.....	26
6. Bibliografía	27

1. Introducción

La búsqueda de alternativas a los métodos tradicionales para aumentar la vida útil de alimentos no procesados ha experimentado un crecimiento exponencial durante los últimos años. La preocupación por los posibles efectos adversos de los residuos químicos en la salud, la creciente demanda de alimentos saludables más seguros, así como las preocupaciones crecientes por el medio ambiente son las causas que han abierto las puertas a la investigación en este campo (Spadaro *et al.*, 2005).

Una de las áreas a las que se han dedicado más esfuerzos es el control de enfermedades en productos hortofrutícolas, debido a las importantes pérdidas que éstas causan tanto en campo como en la posterior post-cosecha. Estas pérdidas pueden llegar a representar hasta un 25% del total de la producción en países industrializados y más de un 50% en aquéllos en vías de desarrollo (Liu *et al.*, 2013).

En este sentido, el control biológico es una de las alternativas al uso de fungicidas químicos con mayor potencial para reducir el deterioro producido por hongos en frutas (Droby *et al.*, 2009; Spadaro y Gullino, 2004). El biocontrol consiste en la utilización de microorganismos (agentes de biocontrol, ABCs o antagonistas) para prevenir enfermedades en vegetales (Emmert y Handelsman, 1999). El principal problema de los ABCs es su elevada sensibilidad a condiciones ambientales adversas, lo cual ocasiona una elevada variabilidad y baja reproducibilidad en el nivel de control, entre diferentes cosechas anuales y entre diferentes regiones climáticas (Elmer y Reglinski, 2006). Se han estudiado diversas estrategias para conseguir disminuir la sensibilidad de los ABCs, así como para mejorar su condiciones prácticas de aplicación (Abadías *et al.*, 2003; Teixidó *et al.*, 1998). Una de estas estrategias es su aplicación conjunta con recubrimientos comestibles (RCs). Éstos podrían mejorar la adherencia y distribución sobre la superficie de los vegetales tratados así como su supervivencia y estabilidad con el tiempo, además de aportar una serie de beneficios al alimento recubierto (control de la pérdida de peso, retraso de la maduración, aumento de la resistencia mecánica...).

Los RCs se pueden definir como una fina capa de material obtenido a partir de biopolímeros y otros ingredientes que se aplican sobre las superficies de alimentos, de modo que se forma una fina película sobre ellos (Han, 2014; Lacroix, 2014) y que, además, pueden ser consumidos como parte del producto. Por su parte, las películas comestibles (PCs) se forman previamente y posteriormente son aplicadas a los productos (González-Martínez *et al.*, 2011). Ambos han sido utilizados tradicionalmente como barreras para disminuir la pérdida de humedad y retrasar la senescencia de vegetales mediante la permeabilidad selectiva a los gases (Vargas *et al.*, 2008). La yuba (piel de soja) ha sido empleada en países asiáticos desde el siglo XV (Wu and Bates, 1972; Park *et al.*, 2002) y RCs a base de cera eran ya utilizados en cítricos durante los siglos XII y

XII, y comercializados en manzanas y peras a partir de 1930 (Baldwin, 1994; Debeaufort *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999). Actualmente, se pueden aplicar en infinidad de productos alimenticios, principalmente frutas, verduras, gominolas y frutos secos (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; Petersen *et al.*, 1999), siendo su principal objetivo alargar la vida útil del producto, además de mejorar la calidad del alimento protegiéndolo del deterioro físico, químico y biológico (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008)

Las nuevas generaciones de PCs han sido diseñadas especialmente para permitir la incorporación y/o liberación controlada de antioxidantes, vitaminas, nutraceuticos y agentes antimicrobianos (Vargas *et al.*, 2008). También existe la posibilidad de incorporar microorganismos en su estructura. La mayor parte de estudios en esta línea se han desarrollado con bacterias ácido-lácticas, debido a su capacidad de producir antibióticos y otros metabolitos con actividad antimicrobiana (Concha-Meyer *et al.*, 2011; Léonard *et al.*, 2014; Romano *et al.*, 2014; Sánchez-González *et al.*, 2014). La incorporación en PCs o RCs de microorganismos típicamente empleados como ABCs ha sido también estudiada por diversos autores (Aloui *et al.*, 2015; El-Gaouth *et al.*, 2000; McGuire y Baldwin, 1994; Potjewijd *et al.*, 1995).

La correcta selección de los componentes de las películas y RCs a utilizar como soporte de ABCs es muy importante. La composición de las diferentes formulaciones puede ser variable, obteniéndose así películas de distinta naturaleza. Las PCs están compuestas principalmente por biopolímeros, que pueden ser tanto proteínas como polisacáridos, lípidos, o una mezcla de éstos, de forma que las características físico-químicas de cada matriz influirán en las propiedades de las películas resultantes (Sothornvit y Krochta, 2000). Además, estas propiedades influirán también en su eficacia como soporte de ABCs ya que tendrán un efecto sobre su viabilidad y supervivencia e incluso en su actividad frente a patógenos.

El almidón de maíz (AM) ha sido ampliamente utilizado y estudiado como componente principal para la obtención de películas por tratarse de un recurso renovable, de bajo coste, fácil acceso y con propiedades termoplásticas que permiten que se procese fácilmente (Jiménez *et al.*, 2012; Ortega-Toro *et al.*, 2014). Además, permite la obtención de películas continuas, homogéneas, inodoras, incoloras y con muy baja permeabilidad al oxígeno (Dole *et al.*, 2004). Por otro lado, el caseinato sódico (NaCas), una proteína de origen lácteo, presenta numerosas propiedades para su empleo en la obtención de RCs y las propiedades de las películas obtenidas con esta matriz han sido caracterizadas por numerosos autores (Arrieta *et al.*, 2013; Colak *et al.*, 2015; Fabra *et al.*, 2008; 2009).

En términos generales, ambos hidrocoloides proporcionan buenas propiedades mecánicas y organolépticas a las películas y, además, son barreras efectivas frente a componentes aromáticos y gases (oxígeno y dióxido de carbono). Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica, no

suponen una buena barrera a la transferencia de agua (Han, 2014). Con el fin de mejorar esta y otras propiedades de las películas, se pueden incorporar diferentes componentes minoritarios.

Los agentes plastificantes son necesarios para la obtención de películas a base de AM y NaCas, ya que las películas obtenidas con ambos suelen presentar estructuras rígidas y quebradizas. Los plastificantes actúan aumentando la movilidad molecular en la red polimérica, mejorando así las propiedades mecánicas, aunque reducen las propiedades barrera al vapor de agua (Rosen, 1993). Uno de los plastificantes más empleados para la obtención de películas comestibles es el glicerol, que se añade para mejorar las propiedades mecánicas de las películas y aumentar su flexibilidad (Vieira *et al.*, 2011).

Otras sustancias con capacidad potencial para mejorar algunas de las propiedades de los RCs y PCs son los tensoactivos (Ortega-Toro *et al.*, 2014). Algunos estudios han demostrado que pueden mejorar las propiedades barrera al vapor de agua de las películas (Villalobos *et al.*, 2006) además de aumentar la humectabilidad de las dispersiones formadoras de películas (Jovanovich y Añón, 1999; Rodríguez *et al.*, 2006) lo cual facilitaría su aplicabilidad sobre alimentos.

El balance hidrófilo-lipófilo (BHL) influye de manera importante en el comportamiento de los tensoactivos. Esta característica de los tensoactivos viene determinada por el balance entre los grupos polares y apolares en la molécula y dicta cuál será su comportamiento (Griffin, 1949). Por ejemplo, un valor bajo de BHL indica un balance lipofílico predominante en la estructura molecular que puede contribuir a limitar la permeabilidad al vapor de agua de las películas. Un valor más alto podría mejorar la integración de estos compuestos en la matriz hidrófila (Ortega-Toro *et al.*, 2014).

Como se ha comentado anteriormente, una de las alternativas con más potencial en relación a la aplicación de RCs y al control biológico, es la incorporación de ABCs en películas biodegradables con la finalidad de aprovechar los beneficios que éstas pueden suponer para los antagonistas. Las levaduras han sido muy empleadas como ABCs por su capacidad para ejercer un efecto antagonista frente a patógenos de productos vegetales. Esto se debe a que su acción inhibitoria no implica la producción de metabolitos potencialmente tóxicos como antibióticos (Wisniewski y Wilson, 1992) y a que su la fuente más habitual para aislarlas es la superficie de frutas (Wilson y Winisewski, 1989; Wilson *et al.*, 1993). El mecanismo de acción más habitual de las levaduras como ABCs es la competición por espacio y nutrientes (Liu *et al.*, 2013)

Concretamente, la levadura *Candida sake* ha sido ampliamente estudiada como ABC ya que ha resultado ser efectiva en el control de enfermedades fúngicas como las producidas por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus nigricans* en diferentes tipos de fruta como la manzana y la fresa (Viñas *et al.*, 1997; Viñas *et al.*, 1998, Usall *et al.*, 2000). Su principal potencial de aplicación está en la uva ya que ha demostrado ser capaz de controlar la

podredumbre gris causada por *B. cinerea*, enfermedad que causa grandes pérdidas en este cultivo, de gran importancia económica en España (Calvo-Garrido *et al.*, 2013; Cañamás *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la ingestión de las dosis aplicadas en biocontrol no presentan ningún peligro tóxico para la especie humana, puesto que la levadura no puede desarrollarse a temperaturas de 37°C, y es rápidamente destruida en contacto con el jugo gástrico (Usall *et al.*, 2000).

2. Objetivos

La naturaleza de las matrices utilizadas para la obtención de películas comestibles (PCs), así como la combinación con los diferentes componentes minoritarios son determinantes en la estructura resultante del recubrimiento. Por esto, los objetivos de este trabajo fueron la caracterización de películas biodegradables a base de almidón de maíz (AM) o caseinato sódico (NaCas) como soporte para el ABC *Candida sake* y el estudio de su viabilidad en las películas tras el almacenamiento de éstas bajo diferentes condiciones ambientales. A fin de alcanzar los objetivos generales, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Diseño de las formulaciones y caracterización de las películas biodegradables sin la incorporación del ABC en términos de espesor, humedad y propiedades barrera (permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno).
- Estudio de la viabilidad de *Candida sake* incorporada a películas biodegradables tras la etapa de secado (48 horas) y en función del tiempo de almacenamiento bajo diferentes condiciones.

Los componentes minoritarios utilizados para la formulación de las películas fueron: glicerol como agente plastificante, y tensoactivos con diferente BHL: ácido oleico (AO, BHL = 1,0), monooleato de sorbitán o Span® 80 (S80, BHL=4,3), y trioleato de polietilenglicol de sorbitán o Tween® 85 (T85, BHL=11,0).

Para llevar a cabo los objetivos establecidos, se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Diseño de las dispersiones formadoras de películas (DFP) con y sin la incorporación de tensoactivos, en base a estudios anteriores y pruebas previas realizadas.
2. Obtención de las películas y caracterización de su contenido en humedad, espesor y propiedades barrera al vapor de agua y al oxígeno (PVA y PO).
3. Obtención de películas con *Candida sake* y estudio de la viabilidad del ABC tras el periodo de secado de las mismas.
4. Almacenamiento de las películas con ABC a distintas condiciones de humedad relativa durante diferentes tiempos, para estudiar el efecto de ambas variables sobre la viabilidad del ABC.
5. Determinación de la humedad de las películas con ABC, por considerarse la propiedad que puede influir de una manera más directa en la viabilidad del mismo.
6. Análisis microestructural de las películas con antagonista, a fin de observar la estructura de las películas así como la distribución de la levadura sobre éstas.

7. Análisis estadístico para determinar la influencia del tipo de polímero y de la incorporación de los distintos tensoactivos utilizados sobre las características físico-químicas de las películas y sobre la viabilidad del ABC, así como para analizar la influencia del tiempo y las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad del ABC.

3. Materiales y métodos

3.1. Preparación de las dispersiones formadoras de películas

El AM fue suministrado por Roquette Laisa España S.A. (Valencia), mientras que el NaCas y los tres tensoactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid). El glicerol fue suministrado por Panreac Química S.L.U. (Barcelona).

El AM (2% p/p) se dispersó en agua desionizada y se gelatinizó en un baño termostático a 95°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos aproximadamente. Transcurrido este tiempo se enfrió hasta temperatura ambiente. El NaCas (2% p/p) fue dispersado en agua desionizada y se mantuvo en agitación hasta su completa disolución a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas.

En las dispersiones formadoras de películas (DFP) de ambos polímeros se añadió glicerol en una proporción másica de polímero:glicerol 1:0,25, y los tensoactivos en una proporción polímero:tensoactivo 1:0,1. Las concentraciones de biopolímeros, así como las proporciones de polímero:glicerol y polímero:tensoactivo se seleccionaron en base a estudios previos (Sánchez-González *et al.*, 2009, Jiménez *et al.*, 2012 y Sánchez González *et al.*, 2013). Así pues, se obtuvo un total de 8 formulaciones, con y sin tensoactivos: AM, AM-AO, AM-S80, AM-T85, NaCas, NaCas-AO, NaCas-S80 y NaCas-T85.

Las dispersiones se homogeneizaron durante 4 minutos a 13600 rpm con un rotor stator Ultraturrax (DI25, Janke and Kunkel, Alemania) y se esterilizaron para reducir su carga microbiana. En los casos en los que fue necesario se desgasificaron a vacío mediante una bomba (MZ 2C NT, Vacuubrand GMBH + CO KG, Wertheim, Alemania).

Las DFP, con y sin tensoactivos, se vertieron sobre placas de teflón de 15cm de diámetro, colocadas sobre una superficie nivelada. Se pesó la cantidad necesaria de cada formulación para conseguir una densidad superficial de sólidos de 5,6 mg/cm², lo cual equivaldría a 1 g de sólidos formadores de película por película, valor establecido con el objetivo de poder comparar las películas. Las DFP se dejaron secar durante aproximadamente 48 h a una humedad relativa del 45% y posteriormente se retiraron de las placas.

3.2. Caracterización de las películas

Como paso previo a la caracterización, las películas se acondicionaron a una humedad relativa (HR) del 53% durante una semana. Para ello, se introdujeron en desecadores de vidrio que contenían una disolución sobresaturada de nitrato de magnesio (Panreac Química S.L.U. Barcelona, España) y se mantuvieron a 25°C.

3.2.1. Contenido en humedad

El contenido en humedad de las películas fue determinado por triplicado gravimétricamente mediante una balanza analítica (ME36S, Sartorius, Alemania). Las películas fueron secadas a 60°C durante 24 h en una estufa de convección con el objetivo de eliminar el agua menos ligada de su estructura, y posteriormente se introdujeron en una estufa de vacío en las mismas condiciones. A continuación se introdujeron en un desecador con pentóxido de fósforo (Panreac Química S.A. Castellar de Vallés, Barcelona, España) el tiempo necesario hasta alcanzar un peso constante (15 días aproximadamente).

3.2.2. Espesor

El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro electrónico digital modelo Palmer (Comecta, Barcelona, España) con una precisión de 0,001 mm. Se tomaron valores en seis puntos de la película de forma aleatoria. Las medidas se tomaron en cuatro películas por formulación y se utilizaron posteriormente para el tratamiento de los resultados en los ensayos de PVA y PO.

3.2.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Para la determinación de la PVA se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para un gradiente de humedad relativa 53-100% y una temperatura de 25°C.

Se recortaron 3-4 muestras circulares para cada formulación de 3,5 cm de diámetro, seleccionando películas sin defectos visibles. Estas muestras se acoplaron sobre copas de aluminio de 3,5 cm de diámetro (Payne, Elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se habían depositado 5 ml de agua destilada (HR 100%). La cara de la película en contacto con el aire durante el secado se colocó hacia el ambiente y para asegurar la hermeticidad del sistema, se colocó un anillo de caucho y dos mordazas. Las copas se introdujeron en un soporte con un ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados con soluciones sobresaturadas de $Mg(NO_3)_2$ (53% HR). Los desecadores se almacenaron en una cámara Hotcold UL (JP Selecta, Barcelona, España) y se monitorizó la masa de las copas con las películas con una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante 24 h.

La pendiente de la representación de la pérdida de masa frente al tiempo se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua (VTVA). La presión de vapor de agua en la cara interior de la película (p_2) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.*, (1993) para corregir el efecto de gradientes de concentración establecidos en el espacio de cabeza de la copa (ecuación 1).

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot Ln \left[\frac{(P - p_2)}{(P - p_1)} \right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (1)$$

Donde P = presión total (atm), D = difusividad del agua en aire a 25°C (m²/s), R = constante de los gases (82,057 · 10⁻³ m³ atm kmol⁻¹ K⁻¹), T = temperatura (K), Δz = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final, p₁ = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm), p₂ = presión de vapor corregida en la cara interior de la película.

Utilizando la ecuación 2, la PVA se calculó a partir de p₂ la presión de vapor de agua en la cara exterior de la película (p₃) y el espesor (e).

$$PVA = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot e \quad (2)$$

3.2.4. Permeabilidad al oxígeno (PO)

Para determinar la permeabilidad al oxígeno de las películas, se utilizó un equipo Ox-Tran modelo 2/21 ML Mocon (Lippke, Neuwied, Alemania) a una temperatura de 25°C y una HR del 53 %. Se consideró el método estándar D3985-95 (ASTM, 2002) para realizar las mediciones (4 por formulación). Se determinó la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) cada 20 minutos hasta que se alcanzó el equilibrio. Este valor se transformó en OP (ecuación 3) teniendo en cuenta el gradiente de presión de oxígeno a ambos lados de la película y el espesor de la misma. El área de exposición al flujo de oxígeno durante el ensayo fue de 50 cm².

$$OP = \frac{OTR}{pO_2} \cdot e \quad (3)$$

3.3. Viabilidad de *Candida sake* incorporada en las películas

3.3.1. Preparación del inóculo de *Candida sake*

La cepa de la levadura *Candida sake* empleada en el presente trabajo fue aislada de la superficie de manzanas por el centro UdL-IRTA (Lleida, España) y fue depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo en la Universidad de Valencia (Burjassot, España).

La producción celular y la formulación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en Cañamás *et al.*, (2011). Partiendo de una triple estría de *Candida sake* incubada a 25°C durante 48h en medio tripticasa-soja agar (TSA) (Scharlab, Barcelona), se preparó una suspensión de células en agua estéril, de la cual se conoció su concentración mediante un conteo con Cámara Thoma. A continuación se determinó el volumen necesario de esta suspensión para inocular un

medio líquido de crecimiento para la levadura una concentración de 10^4 UFC/ml. El medio líquido se preparó con agua desionizada y su composición fue de 40 g/L de melazas y 1,2 g/L de urea y se incubó durante 48 h a 25°C y en agitación a 150 rpm.

Tras este tiempo, las células se separaron por centrifugación a 8631 xg a 10°C durante 10 minutos. A continuación se eliminó el sobrenadante y se recuperó la pasta de células con el mismo volumen de agua estéril para obtener la suspensión de trabajo, cuya concentración se determinó de nuevo por Cámara Thoma.

3.3.2. Inoculación de las DFP y obtención de las películas

Una vez conocida la concentración de la suspensión de células se determinó el volumen necesario para la inoculación de las DFP en una concentración final de $5 \cdot 10^7$ UFC/película, lo cual equivaldría a $2,83 \cdot 10^5$ UFC/cm² (proporción g sólidos formadores de película:UFC de $1:5 \cdot 10^7$ UFC). A continuación, las DFP con el inóculo fueron agitadas a 150 rpm durante 10 minutos para conseguir una distribución homogénea del microorganismo. Tras la inoculación, se vertieron las DFP sobre placas de teflón del mismo modo descrito en el apartado 2.1.

Tras la obtención de las películas con el ABC, éstas se dividieron de la siguiente forma:

- Un parte de las películas fue utilizada para la determinación de viabilidad del ABC inmediatamente después del secado.
- Otra parte de las películas fue introducida en desecadores con una HR de 53% o de 68% a 25°C, utilizando disoluciones sobresaturadas de $Mg(NO_3)_2$ y de KI (Panreac Química, S.L.U, Barcelona) respectivamente, para posteriormente determinar el contenido en humedad de las películas almacenadas a distintas condiciones.
- El resto de películas se almacenaron también en desecadores con un 53% y 68% de HR a 25°C, para la determinación de viabilidad tras 1, 2 y 3 semanas de almacenamiento.

3.3.3. Análisis de viabilidad de *Candida sake* en las películas

El análisis de la viabilidad del ABC incorporado en las películas se llevó cabo por triplicado para cada formulación. Las películas se introdujeron en bolsas de plástico estériles con agua desionizada estéril con un 0,01% (w/v) de Tween 85, y se homogeneizaron durante 6 minutos en un homogeneizador Stomacher (MiniMix, Interscience). Las diluciones en serie, hasta un máximo de 10^{-4} , se realizaron por duplicado y se sembraron por superficie con un asa de Digrafsky sobre medio de agar TSA con estreptomycinina (0,5 g/L) para evitar el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron durante 48 h a 25°C en oscuridad y las colonias de *Candida sake* fueron contadas en función de sus características morfológicas.

3.4. Microestructura de las películas con *Candida sake*

A fin de estudiar la estructura a nivel microscópico de las películas, pequeños fragmentos de éstas fueron depositados sobre portaobjetos. Con un microscopio óptico (Química y medio ambiente S.L., Leica) se capturaron imágenes con los objetivos de 20x y 63x. Se tomaron imágenes a distintas semanas para estudiar las posibles diferencias en la estructura y densidad de las células de *Candida sake*.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test LSD. Los cálculos se realizaron con el Software STATGRAPHICS Centurion XVI (Version 16.2.04).

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de las películas

4.1.1. Humedad

La tabla 1 recoge los resultados del análisis de las propiedades físicas de las películas en términos de humedad, espesor, PVA y PO.

Tabla 1. Contenido en humedad (g agua / 100 g película seca), espesor (μm), permeabilidad al vapor de agua ($(\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$) y permeabilidad al oxígeno ($\text{cm}^3\cdot\text{mm}/\text{m}^2\text{ atm}\cdot\text{día}$). Valores medios y desviaciones entre paréntesis

Formulación	Humedad (%)	Espesor (μm)	PVA ($(\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m})\cdot 10^{11}$)	PO ($\text{cm}^3\text{mm}/\text{m}^2\text{ atm}\cdot\text{día}$)	
AM	ST	9,4 (0,8) ^c	42(5) ^a	121 (7) ^a	0,56 (0,05) ^a
	AO	8,3 (0,5) ^b	46,9(0,8) ^a	152 (8) ^c	4,8 (0,3) ^c
	S80	8,9 (0,7) ^{bc}	59 (4) ^{bc}	178 (9) ^{de}	3,8 (0,2) ^b
	T85	8,4 (0,8) ^b	46 (2) ^a	163 (29) ^{cd}	4,11 (0,12) ^b
NaCas	ST	8,3 (0,5) ^b	62 (6) ^c	196 (14) ^{ef}	3,52 (0,05) ^a
	AO	8,0 (0,6) ^b	54 (6) ^b	145 (17) ^{bc}	6,00 (0,06) ^c
	S80	7,0 (0,6) ^a	65 (2) ^c	201 (14) ^{ef}	4,7 (0,4) ^b
	T85	6,2 (0,5) ^a	64(7) ^c	211 (8) ^f	7,2 (0,5) ^d

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las formulaciones. AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato de sodio, ST: sin tensoactivo, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

En términos generales, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el contenido en humedad de las películas a base de AM y NaCas. No obstante, las películas de AM presentaron una cierta tendencia hacia humedades más elevadas, correspondiendo los contenidos en agua más elevados a las películas de este polisacárido sin tensoactivos. Esta tendencia probablemente está relacionada con el carácter altamente hidrofílico del almidón.

Para ambas matrices la adición de tensoactivos tuvo efectos significativos ($p < 0,05$) sobre la humedad, de forma que el valor de ésta disminuyó prácticamente en todos los casos. Estos resultados se muestran en coherencia con los de otros estudios, en los que la incorporación de

material lipídico en películas a base de AM y NaCas introdujo descensos en su contenido en humedad (Fabra *et al.*, 2009; Ortega-Toro *et al.*, 2014). Esto podría deberse a que reducción de la capacidad de las cadenas de hidrocoloides para unirse a moléculas de agua derivada de la adición de tensoactivos a la matriz. Al establecerse puentes de hidrógeno entre los grupos polares de los tensoactivos y las cadenas de hidrocoloides se reduciría el número de grupos polares disponibles para interactuar con el agua (Villalobos *et al.*, 2006). Sin embargo, no se observa un patrón claro del descenso de la humedad de las películas en función del tipo de tensoactivo empleado. Así pues, el AO fue el que dio lugar a un contenido en humedad más bajo en las películas de AM mientras que en las de NaCas fue el T85.

4.1.2. Espesor

El valor medio de espesor de todas las películas caracterizadas osciló entre 42 y 65 μm . En general, las películas de proteína presentaron un espesor superior al de las de AM. Esto parece estar relacionado con el menor grado de empaquetamiento de las moléculas de proteína en comparación con las de AM. Las cadenas de polisacáridos del AM, debido a su estructura, tienden a empaquetarse y a dar lugar a estructuras más compactas, lo cual se traduce en menores espesores. En cuanto a la incorporación de tensoactivos, se observó de forma general un aumento del espesor de las películas, excepto en el caso del NaCas-AO, que presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) respecto al resto de películas de NaCas. El incremento del espesor de las películas por la presencia de tensoactivos parece estar relacionado con una estructura más heterogénea de las películas que los incorporan.

4.1.3. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA se encuentra estrechamente relacionada con la humedad de las películas, así como con la microestructura de las mismas. En la tabla 1 pueden observarse los valores de PVA obtenidos para las diferentes formulaciones, de los cuales se puede deducir la gran influencia que tiene el tipo de bpolímero empleado sobre esta propiedad. Se obtuvieron, de forma general, películas menos permeables en el caso del AM, probablemente por su estructura más homogénea, frente a la estructura más abierta de la matriz proteica, la cual facilitaría el paso de agua a través de las películas. No obstante, en cualquier caso, al tratarse de matrices predominantemente hidrofílicas presentan pobres propiedades barrera al vapor de agua en comparación con otros polímeros biodegradables (Fabra *et al.*, 2014).

La adición de tensoactivos a las películas tuvo un efecto significativo sobre la PVA, aunque este efecto fue variable según la matriz y según el tensoactivo. En el caso de las películas de AM, la presencia de tensoactivos aumentó en todos los casos la PVA de las películas, probablemente por la introducción de heterogeneidad en su estructura que podría facilitar el paso de agua. En cuanto a las películas de NaCas, el AO ocasionó un descenso significativo de la PVA ($p < 0,05$)

respecto a la matriz sin tensoactivo, lo cual se puede explicar por el hecho de que este tensoactivo es de naturaleza altamente hidrofóbica, tal y como refleja su bajo BHL. Por su parte, la incorporación de S80 y T85 no modificó significativamente la PVA, respecto a las películas sin tensoactivo.

Este diferente efecto de los tensoactivos sobre las matrices puede estar relacionado con las diferentes interacciones matriz-tensoactivo que introducen diferencias estructurales en las películas obtenidas en cada caso. Así pues, la diferente naturaleza de la matriz y de los tensoactivos, conllevaría una diferente interacción entre las moléculas, provocando diferencias estructurales entre las películas e influyendo directamente sobre las propiedades de las mismas. De esta forma, el empaquetamiento de las cadenas de hidrocoloide podría verse interrumpido por la presencia de tensoactivos, dando lugar a películas más heterogéneas, y por tanto con menores propiedades barrera.

4.1.4. Permeabilidad al oxígeno (PO)

Como ocurrió con el resto de propiedades que se caracterizaron, se observaron también diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre la PO de las películas en función del tipo de polímero. La matriz pura de AM presenta una muy baja PO, probablemente por la homogeneidad y compacidad de su estructura. Por el contrario, las películas de NaCas, presentaron valores significativamente superiores de PO, probablemente debido de nuevo al menor empaquetamiento de la estructura proteica.

La adición de tensoactivos resultó en todos los casos en un aumento significativo ($p < 0,05$) de la PO. Esto podría atribuirse a la naturaleza hidrofóbica de estas sustancias, que potencian las interacciones lípido-polímero, introduciendo irregularidades estructurales en el seno de la matriz que aumentan el intercambio gaseoso y por tanto, la PO (Zhong *et al.*, 2011; Ortega-Toro *et al.*, 2014).

4.2. Viabilidad de *Candida sake* incorporada en las películas

4.2.1. Efecto de la etapa de secado de las películas

En la figura 1 se muestran los resultados de viabilidad del ABC obtenidos en las formulaciones con y sin los diferentes tensoactivos tras 48 h de secado de las películas, expresada como el logaritmo de unidades formadoras de colonias por unidad de superficie ($\log \text{UFC}/\text{cm}^2$). La línea horizontal indica la densidad superficial inicial de ABC inoculada en las películas.

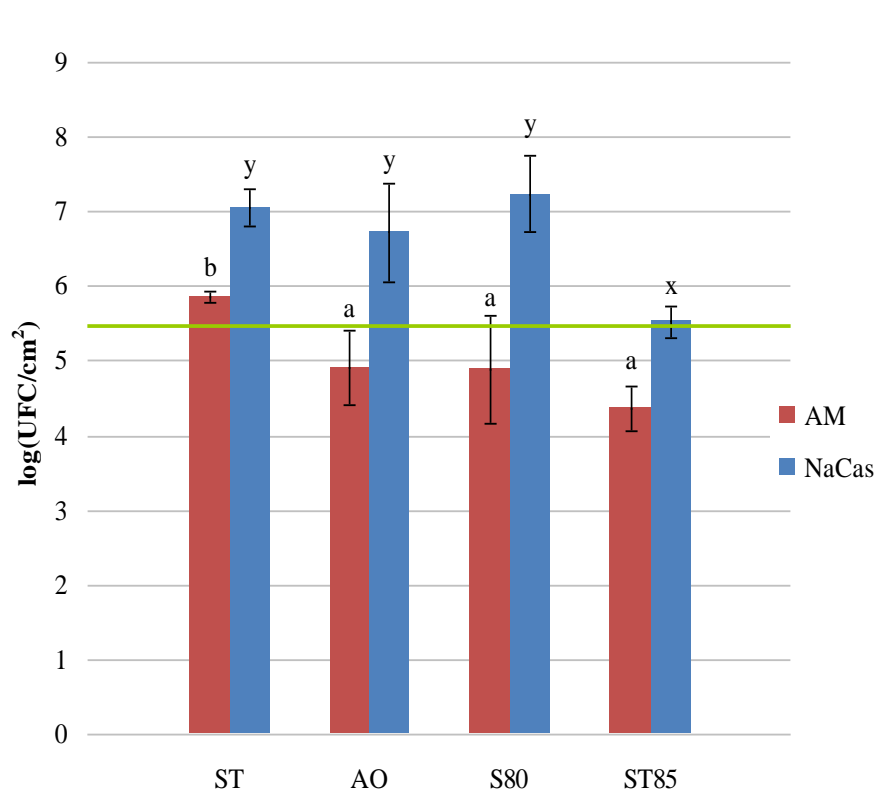


Figura 1. Viabilidad de *Candida sake* en log (UFC/cm²) tras 48 h de secado de las películas. AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato sódico, ST: sin tensoactivo, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85. Letras diferentes (a-b y x-y) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las películas de AM y NaCas respectivamente. La línea horizontal indica la densidad superficial inicial de ABC inoculada en las películas.

Tras el periodo de secado de las películas (48h) se observaron diferentes comportamientos de la levadura en función del tipo de matriz y tensoactivos, dando lugar a diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las películas. En las películas a base de NaCas, la población de ABC tras la etapa de secado fue superior al de la población inoculada inicialmente. Este incremento fue significativo para las películas sin tensoactivo, NaCas-AO y NaCas-S80, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellas. En cambio, para las películas a base de AM, este incremento de la población únicamente se observó para las películas sin tensoactivo. Para las tres formulaciones de AM con tensoactivos, la población de *Candida sake* inicialmente inoculada se vio reducida después de 48 horas de secado.

Así pues, las películas de NaCas constituyeron un medio más apto para la supervivencia del antagonista, lo cual coincidiría con estudios previos donde Gialamas *et al.*, (2010) y Sánchez-Gonzalez *et al.*, (2013; 2014) observaron la mayor aptitud del medios proteicos para la supervivencia de bacterias lácticas. Estos resultados podrían atribuirse a la hidrólisis que sufre la proteína durante la etapa de esterilización de las dispersiones formadoras de película, que daría

lugar a la presencia de aminoácidos libres que podrían suponer un nutriente fácilmente disponible para las levaduras.

Respecto a la presencia de tensoactivos, no se observó un patrón claro de su influencia sobre la viabilidad de las células en ambas matrices. En las películas de naturaleza proteica, se observan valores sin diferencias significativas en las formulaciones sin tensoactivo, con AO y con S80, mientras que para el T85 se observa un descenso significativo ($p < 0.05$) de la supervivencia del antagonista. Por otro lado, en las formulaciones de AM, se produce un descenso de la población en todos los casos en los que se añadió tensoactivo, siendo también en este caso el T85 el menos apto para la supervivencia de *Candida sake*. Coherentemente con los resultados de caracterización de las películas, las interacciones específicas de cada matriz con los tensoactivos provocarían diferencias en las propiedades de las películas influyendo directamente sobre la supervivencia del antagonista.

4.2.2. Humedad de las películas

Con el fin de estudiar la posible influencia de la humedad de las películas sobre la viabilidad del antagonista, se estudió la humedad de equilibrio de las películas con antagonista a las dos condiciones de HR ensayadas, 53 y 68% (tabla 2).

Tabla 2. Humedad de las películas (g agua / 100 g película seca) de las películas tras el acondicionamiento en HR de 53 y 63%

Formulación		Humedad (g agua/100g película seca) acondicionas a 53%HR	Humedad (g agua/100g película seca) acondicionas a 68%HR
AM	ST	12,0 (0,4) ^{ab1}	17 (3) ^{abc1}
	AO	16 (3) ^{bc1}	15 (3) ^{a1}
	S80	15,3 (1,2) ^{abc1}	14,5 (1,2) ^{a1}
	T85	11,6 (0,7) ^{a1}	16,0 (1,7) ^{ab 2}
NaCas	ST	14 (2) ^{abc1}	18 (3) ^{abc1}
	AO	18 (5) ^{c1}	19,82 (1,09) ^{bc1}
	S80	14,9 (1,4) ^{abc1}	20,4 (1,6) ^{c2}
	T85	14,0 (0,3) ^{abc1}	15,5 (0,9) ^{a2}

Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores (^{abc} para las formulaciones, ^{1,2} para las condiciones). AM: Almidón de maíz, NaCas: caseinato sódico, ST: sin tensoactivo, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

De la comparación de estos resultados con los presentados en la tabla 1 se deduce el efecto de la presencia del ABC sobre la humedad de las películas. Estos resultados son coherentes con los presentados por Sánchez-González *et al.*, (2013), que también observaron estas diferencias al incorporar bacterias lácticas en matrices de NaCas, entre otras.

Los resultados de la tabla 2 reflejan una débil influencia de la formulación (polímero y tensoactivo) sobre la humedad de las películas. Además, la humedad relativa de almacenamiento (53 o 68%) no tuvo un efecto significativo sobre la humedad de equilibrio de las películas ($p > 0.05$).

4.2.3. Evolución de la viabilidad durante el almacenamiento

En las figuras 2 y 3 se observa la evolución de la supervivencia de *Candida sake* en las matrices de NaCas y AM, en función del tiempo (48 h de secado y 1, 2 y 3 semanas de almacenamiento), y de las condiciones ambientales de almacenamiento (53 y 68% HR).

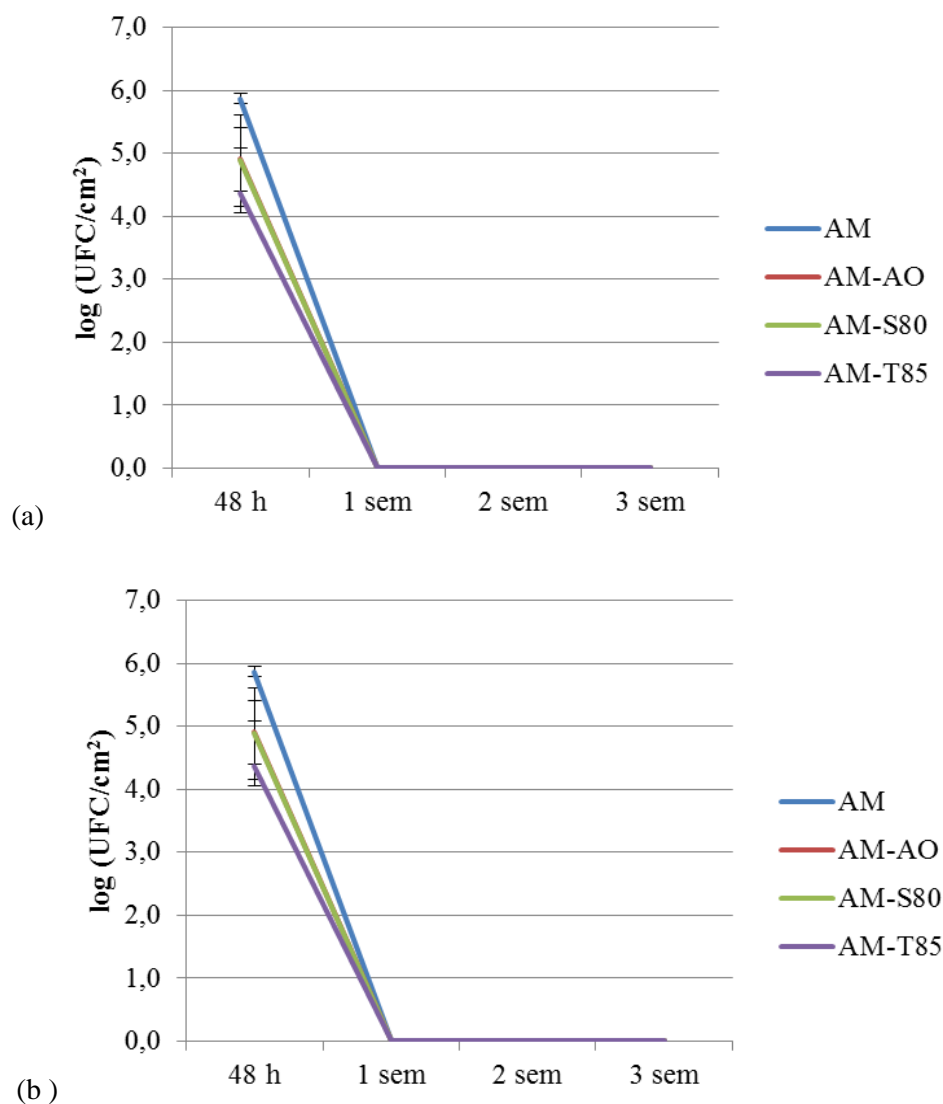


Figura 2. Evolución de la viabilidad de *Candida sake* en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento (a) HR 53% y (b) HR 68% en las películas de almidón de maíz. AM: almidón de maíz, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

Como puede observarse en la figura 2, y para ambas condiciones de HR, la viabilidad del ABC fue nula desde la primera semana de almacenamiento para todas las formulaciones a base de almidón de maíz. De acuerdo con la tendencia observada inmediatamente después del secado de las películas (figura 1), el almidón no supuso un medio propicio para favorecer la viabilidad del ABC, probablemente debido a la baja disponibilidad de agentes nutritivos para la levadura, lo que afecta negativamente a la supervivencia de la misma, independientemente de la humedad relativa de almacenamiento.

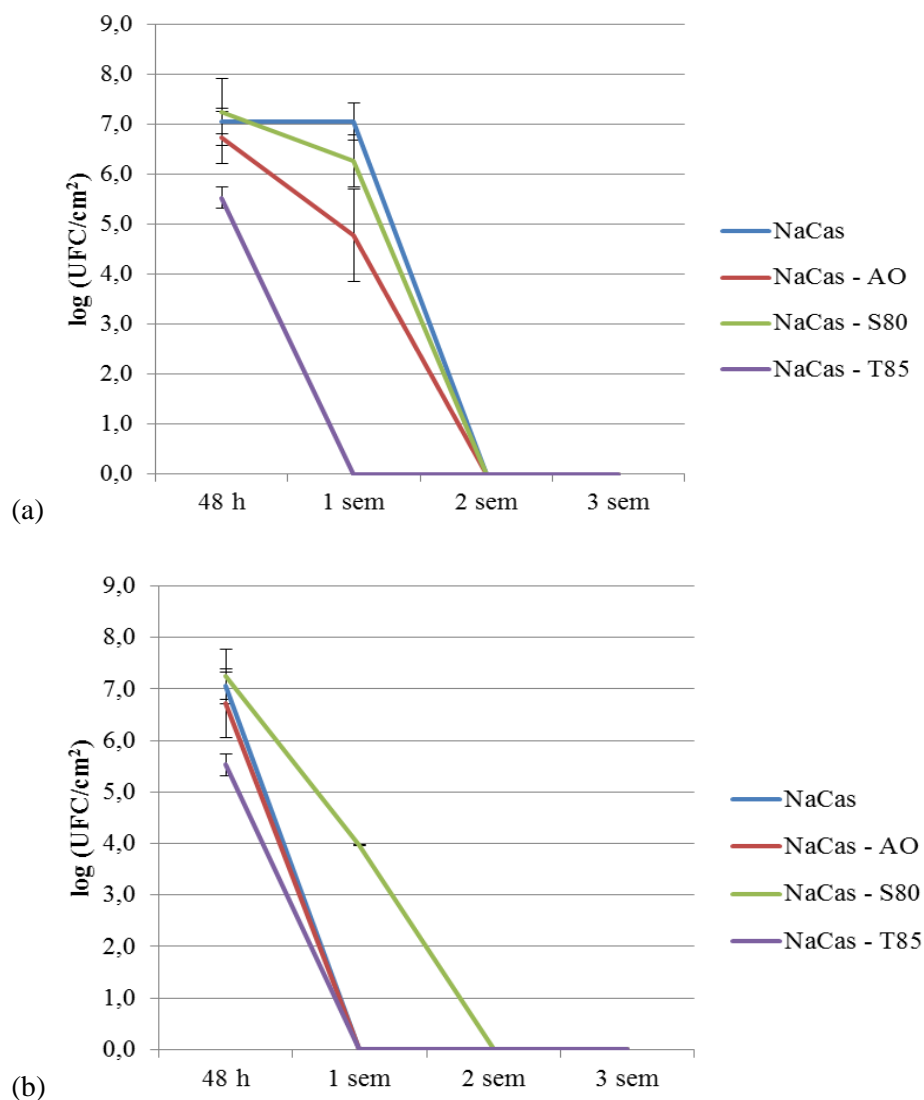


Figura 3. Evolución de la viabilidad de *Candida sake* en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento (a) HR 53% y (b) HR 68% en las películas de caseinato de sodio. NaCas: caseinato de sodio, AO: ácido oleico, S80: Span 80, T85: Tween 85.

Por otro lado, y como ya se ha comentado en el apartado 4.2.1., las películas de NaCas constituyeron un medio más apto para la supervivencia del antagonista, y coherentemente se obtuvieron recuentos no nulos tras una semana de almacenamiento (figura 3). La viabilidad de la levadura se vio favorecida en películas almacenadas a 53% HR mientras que a 68% HR solamente las películas de NaCas – S80 dieron recuentos no nulos. Coherentemente con los resultados de viabilidad tras el secado, los peores resultados de viabilidad durante el almacenamiento de películas de NaCas se obtuvieron al incorporar T85. De nuevo estos resultados son atribuibles a la presencia de aminoácidos libres debido a la etapa de

esterilización, y a una estructura más abierta y permeable que proporcionaría las mejores condiciones para la supervivencia del microorganismo.

Las diferentes condiciones de HR no supusieron diferencias significativas en la humedad de las películas (tabla 2), aunque sí en la actividad de agua de las películas equilibradas al 53% HR ($a_w=0.53$) y 68% HR ($a_w=0.68$). Esta propiedad, directamente relacionada con la disponibilidad del agua en el sistema, es determinante para la supervivencia de los microorganismos. Así pues, a la menor actividad de agua estudiada (0,53) los microorganismos parecen encontrarse en un estado aletargado con una baja disponibilidad de agua, permaneciendo viables, sin luchar por su supervivencia. Por el contrario, a 0,68, la mayor disponibilidad de agua favorece la actividad del microorganismo, pero la ausencia de nutrientes reduce su viabilidad en estas condiciones.

4.3. Propiedades estructurales

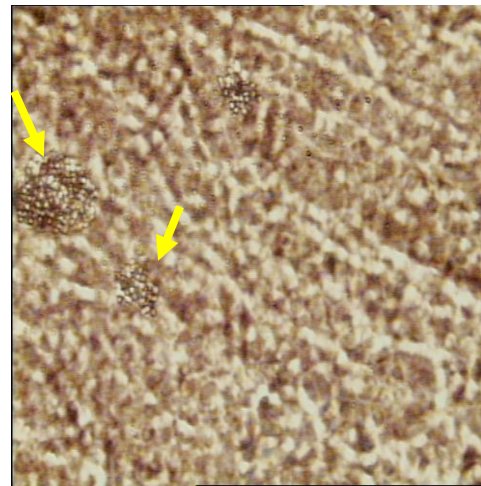
El análisis microestructural de las películas proporciona información relevante acerca de la disposición de los componentes (matrices, tensoactivos y otros agentes como ABCs), lo que, a su vez, permite explicar las diferencias en las propiedades barrera de las películas (Ortega *et al.*, 2014). En la figura 4 se observa la microestructura de las películas obtenidas a base de NaCas y AM sin tensoactivos, donde pueden observarse importantes diferencias en la organización de los polímeros. Por un lado, las películas a base de AM presentan un aspecto más homogéneo, sin rugosidades, acorde a estudios previos donde se observa una disposición compacta de las cadenas de polisacárido (Ortega *et al.*, 2014). Por otra parte, las películas de NaCas presentan una estructura más irregular y abierta. Estas diferencias estructurales serían coherentes con la mayor permeabilidad al agua y al oxígeno de las películas de NaCas (tabla 1).

Respecto a la presencia y distribución de la población de *Candida sake*, en las observaciones microestructurales parece observarse una distribución más homogénea de ésta en las películas de NaCas. La presencia del ABC en estas películas se observa con mayor claridad a 63 aumentos debido a las depresiones y rugosidades de estas matrices poliméricas en comparación con las de AM. Por el contrario en las matrices de AM, se observan agrupaciones de células a lo largo de la película.

(a)



AM 20x

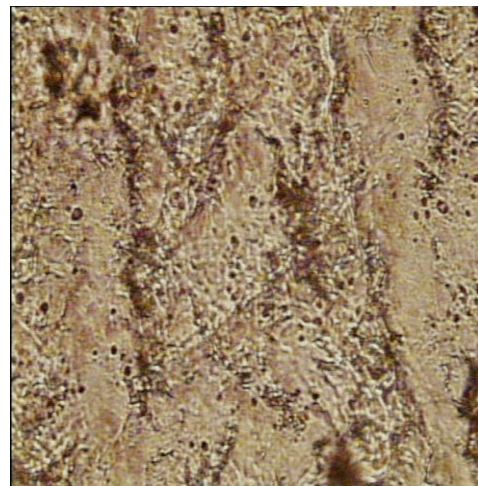


AM 63x

(b)



NaCas 20x



NaCas 63x

Figura 4. Imágenes del microscopio óptico de películas de AM (a) y NaCas (b) con ABC con lentes de 20 y 63 aumentos. Las flechas amarillas indican la presencia de *Candida sake*.

Las figuras 5, 6 y 7 muestran la microestructura de ambas matrices, AM y NaCas con la adición de tensoactivos. Esta incorporación hace que las películas sean menos homogéneas, en coherencia con lo descrito por Ortega *et al.*, (2014) para matrices de AM. Esto es debido a que el empaquetamiento de las cadenas de polisacáridos se ve interrumpido por la presencia de tensoactivos en el seno de la matriz, como puede observarse de forma clara en la figura 5 (AM-AO). En esta figura se puede apreciar la fase lipídica dispersa separada parcialmente de la matriz continua. Esta diferencia es más marcada en el caso del AO por tratarse del tensoactivo

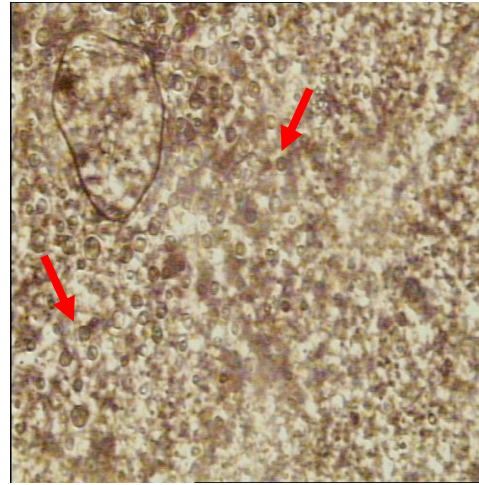
más hidrófobo utilizado en el estudio (BHL=1). La mayor heterogeneidad microestructural de la matriz de NaCas integra en mayor extensión la presencia de los tensoactivos, por lo que apenas se aprecian en las observaciones. Las diferencias microestructurales descritas explicarían los resultados de PVA obtenidos. Así, a menor integración estructural entre AO-matriz mayores valores de PVA (matrices de AM), y viceversa en el caso de matrices de NaCas.

En general para el conjunto de observaciones llevadas a cabo, en relación con la identificación de la presencia de la levadura en el seno de la matriz, solo pudieron observarse con claridad en dos tipos de matrices a base de almidón de maíz, AM y AM-S80. Se observan las células de forma agrupada, sin una distribución homogénea, lo cual podría explicarse también por la estructura cerrada que presenta el almidón, que no permitiría la integración de éstas en la matriz, mientras que en el NaCas quedarían situadas en las rugosidades y porosidades, por lo que no pueden observarse, como ya se ha comentado anteriormente.

(a)



AM-AO 20x



AM-AO 63x

(b)



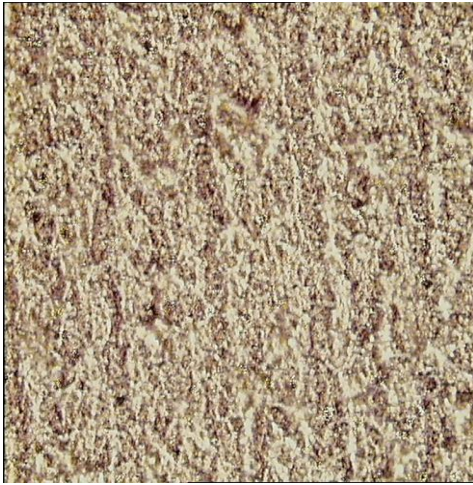
NaCas-AO 20x



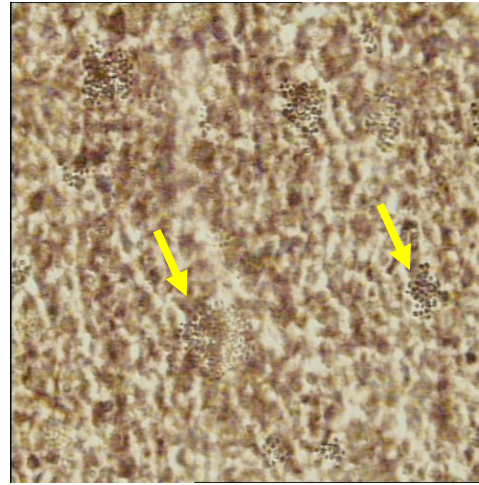
NaCas-AO 63x

Figura 5. Imágenes del microscopio óptico de las películas de AM (a) y NaCas (b) con ABC y AO:ácido oleico, con lentes de 20 y 63 aumentos. Las flechas rojas indican la presencia de AO.

(a)

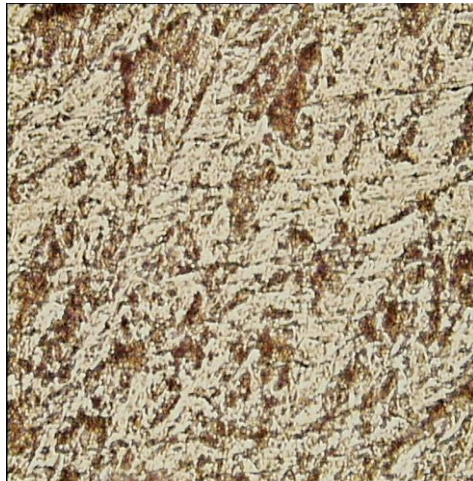


AM-S80 20x

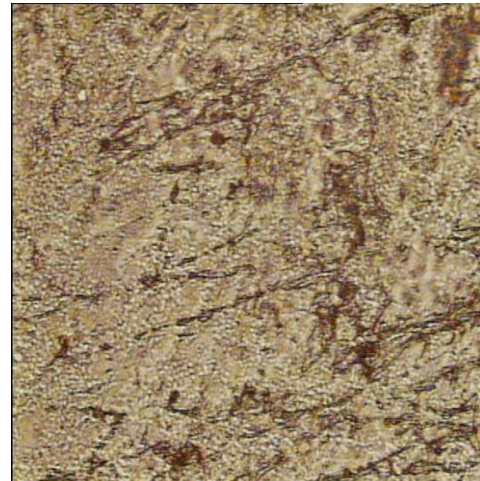


AM-S80 63x

(b)



NaCas – S80 20x



NaCas – S80 63x

Figura 6. Imágenes del microscopio óptico de las películas de AM (a) y NaCas (b) con ABC y S80: Span 80, con lentes de 20 y 63 aumentos. Las flechas amarillas indican la presencia de *Candida sake*.

(a)



AM – T85 20x

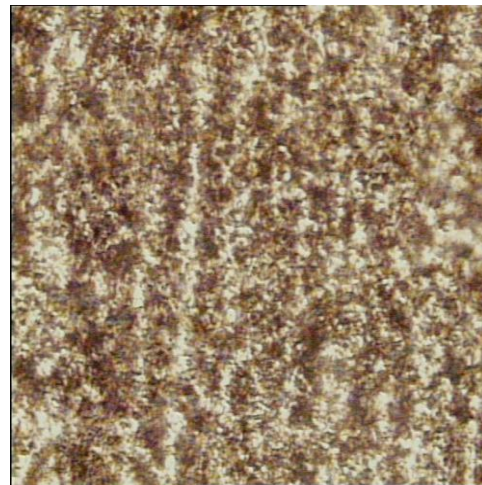


AM – T85 63x

(b)



NaCas – T85 20x



NaCas – T85 63x

Figura 7. Imágenes del microscopio óptico de las películas de AM (a) y NaCas (b) con ABC y T85: Tween 85, con lentes de 20 y 63 aumentos.

5. Conclusiones

Tanto el tipo de biopolímero empleado, como la presencia y tipo de tensoactivos utilizados tuvieron un efecto significativo sobre las propiedades de las películas, lo cual estaría directamente relacionado con la estructura de las mismas. De esta forma, la estructura más homogénea, compacta y cerrada de las cadenas de almidón favorece mejores propiedades barrera en estas películas.

Los tensoactivos determinaron la estructura de la película en función de las interacciones específicas con los polímeros, en base a su balance hidrófilo-lipófilo. De forma general estos produjeron una disminución en la humedad de las películas y un aumento de la PVA y la PO, sin observarse un patrón claro en función del tipo de tensoactivo utilizado.

La formulación (tanto el polímero como el tensoactivo), así como la humedad relativa de almacenamiento, afectaron a la viabilidad del antagonista *Candida sake* en las películas. NaCas presentó las mejores propiedades para el crecimiento de la levadura, probablemente por la presencia de aminoácidos libres resultantes de la etapa de esterilización y por la estructura más abierta y permeable que proporcionaría las mejores condiciones para la supervivencia del microorganismo. La presencia de tensoactivo produjo una disminución en la supervivencia del ABC, siendo el T85 el que menos favoreció su viabilidad.

Solamente se observó supervivencia del ABC tras una semana de almacenamiento a 53% HR en la matriz proteica, sin que existieran diferencias significativas entre la humedad de estos films y los almacenados a 68% HR. La actividad de agua de las películas, y no su humedad, determinó la viabilidad del antagonista.

Las condiciones de HR menor (53%) favorecieron la viabilidad del ABC en comparación con 68%. Una disponibilidad de agua más reducida favoreció la inducción de un estado latente en el microorganismo, en el que permanece aletargado pero viable.

Sería conveniente estudiar la aptitud de otros biopolímeros combinados con diferentes aditivos que confieran una mayor protección del antagonista.

6. Bibliografía

- Abadias, M., Usall, J., Teixidó, N., Viñas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* 93, 436–442.
- Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., Restuccia, C. (2015). Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 22–30.
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. a., Garrigós, M. D. C., Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114(4), 486–494.
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designations: E96–95. In: *Annual Book of American Society for Testing Materials*, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM. (2002). Standard test method for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using coulometric sensor. Standard designation D 3985-05. In *Annual book of ASTM standards* (pp. 472e477). Philadelphia: ASTM.
- Baldwin, E.A. (1994). Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (Eds.), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Technomic, Lancaster, PA, 25–64.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P. A. G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E., Teixidó, N. (2013). Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology*, 62(3), 510–519.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of botrytis cinerea in grapes. *Biological Control*, 56(2), 150–158.
- Colak, B. Y., Gouanve, F., Degraeve, P., Espuche, E., Prochazka, F. (2015). Study of the influences of film processing conditions and glycerol amount on the water sorption and gas barrier properties of novel sodium caseinate films. *Journal of Membrane Science*, 478, 1–11.

- Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22(3-4), 485–489.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299–313.
- Dole, P., Joly, C., Espuche, E., Alric, I., Gontard, N. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 335–343.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137–145.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M., Wilson, C. L. (2000). Application of *Candida saitoana* and Glycolchitosan for the Control of Postharvest Diseases of Apple and Citrus Fruit Under Semi-Commercial Conditions. *Plant Disease*, 84(3), 243–248.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155–177.
- Emmert J., E. A. B., Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a gram-positvie perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 1–9.
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 393-400.
- Fabra, M. J., Jiménez, a., Atarés, L., Talens, P., Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500–1507.
- Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 676–683.
- Fabra, M. J., López-Rubio, A., Lagaron, J. M. (2014). Biopolymers for food packaging applications. *Smart polymers and their applications*, 15, 476-509. Woodhead Publishing.

- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling listeria monocytogenes in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408.
- González-Martínez, C., Cháfer, M., Vargas, M., Sánchez-González, L., Chiralt, A. (2011). Edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. In *Advances in Postharvest Treatments and Fruit Quality and Safety*. Nova Science Publishers Inc., New York, 59–84.
- Griffin, William C. (1949). Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1 (5), 311–26.
- Han, J.H. (2009). *Innovations in food packaging*, Chapter 9: Edible films and coatings: a review, 214–215. Elsevier Ltd.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428–435.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302–310.
- Jovanovich, G., Añón, M. C. (1999). Amylose lipid complex dissociation. A study of the kinetic parameters. *Biopolymers*, 49(1), 81–89.
- Krochta, J.M., De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51 (2), 61–74.
- Lacroix, M., Dang Vu, K. (2014). *Innovations in food packaging*, Chapter 11: edible coating and film materials: proteins, 277–278. Elsevier Ltd.
- Léonard, L., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., Saurel, R., Oulahal, N. (2014). Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells. *Food Control*, 37(1), 200–209.

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
- McGuire, R. G., Baldwin, E. A. (1994). Compositions of cellulose coatings affect populations of yeasts in the liquid formulation and on coated grapefruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 107, 293–297.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., Chiralt, A. (2014). Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 38, 66–75.
- Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 254–260.
- Park, S.K., Hettiarachchy, N.S., Ju, Z.Y., Gennadios, A., (2002). Formation and properties of soy protein films and coatings. In: Gennadios, A. (Ed.), *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press, Boca Raton, FL, 123–137.
- Petersen, K., Væggemose Nielsen, P., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. B., Nilsson, N. H., et al. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 10(2), 52–68.
- Potjewijd, R., Nisperos, M. O., Burns, J. K., Parish, M., Baldwin, E. A. (1995). Cellulose-based coatings as carriers for *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces sp.* in reducing decay of oranges. *HortScience*, 30(7), 1417–1421.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39(8), 840–846.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.
- Rosen, S. L. (1993). *Fundamental principles of polymeric materials* (2nd ed.). New York: Wiley Interscience.

- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2102–2109.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92–98.
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Chiralt, A. (2014). Antilisterial and physical properties of biopolymer films containing lactic acid bacteria. *Food Control*, 35(1), 200–206.
- Sothornvit, R., Krochta, J.M., (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 6298–6302.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91, 185–194.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* 24, 601–613.
- Teixidó, N., Viñas, I., Usall, J., Magan, N. (1998). Control of blue mold of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88(9), 960–964.
- Usall, J., Teixidó, N., Fons, E., Viñas, I. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 83–92.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., González-Martínez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(6), 496–511.
- Vieira, M., Altenhofen, M., Oliveira, L., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 502–509.

- Viñas, I., Usall, J., Teixido, N., y Sanchs, V. (1997). Nueva cepa de levadura *Candida Sake* (Saito and Ota) Van Uden and Buckley y su utilización como agente de control biológico de las enfermedades fungicas de postcosecha en frutas. Patente española 2089981. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Viñas, I., Usall, J., Teixido, N., y Sanchs, V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 6–16.
- Wilson, C., Wisniewski, M., (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27, 425–441.
- Wilson, C., Wisniewski, M., Droby, S., Chalutz, E., (1993). A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*. 53, 183–189.
- Wisniewski, M., Wilson, C. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27(2).
- Wu, L.C., Bates, R.P. (1972). Soy protein-lipid films. 1. Studies on the film formation phenomenon. *Journal of Food Science*, 37 (1), 36–39.
- Zhong, Y., Li, Y. (2011). Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (*pueraria lobata*) starch/ascorbic acid films. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 622–628.