

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



**EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE LACTOFERRINA Y/O
LISOZIMA SOBRE LAS PROPIEDADES DE PELÍCULAS
COMESTIBLES DE ALMIDÓN DE PATATA**

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Presentado por:
Ángela Fernández Fernández

Directoras académicas:
Lorena Atarés Huerta
Amparo Chiralt Boix

Directora Experimental:
Olga Moreno Marro

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE LACTOFERRINA Y/O LISOZIMA SOBRE LAS PROPIEDADES DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN DE PATATA

Ángela Fernández Fernández, Olga Moreno Marro, Lorena Atarés Huerta, Amparo Chiralt Boix

Resumen: Se elaboraron películas comestibles utilizando almidón de patata (PS), lactoferrina (LF), lisozima (LZ) y glicerol (G) como plastificante en distintas proporciones. Se caracterizaron las propiedades físicas, comportamiento térmico y bioactividad de las películas comestibles (propiedades ópticas, mecánicas, microestructurales, humedad de equilibrio, permeabilidad al vapor de agua, temperatura de transición vítrea (Tg) y termo-degradación, actividad antimicrobiana y antioxidante) tras una y cinco semanas de almacenamiento, acondicionadas a 25°C-53%HR. La incorporación de proteínas a la matriz de almidón afectó de forma significativa a las propiedades mecánicas, barrera y ópticas, dando lugar a películas con un descenso generalizado de la rigidez, así como de su resistencia a la fractura y extensibilidad; con una permeabilidad al vapor de agua reducida, menores valores de la luminosidad y un color más saturado. La microestructura de las películas reflejó falta de compatibilidad entre el almidón y las proteínas, aunque el incremento en la Tg del almidón con la incorporación de proteínas sugiere cierto nivel de miscibilidad. Se observó actividad antimicrobiana sólo en el caso de la combinación de ambas proteínas contra la cepa *E. coli*. Las proteínas presentaron actividad antioxidante.

Palabras clave: películas comestibles, almidón de patata, lactoferrina, lisozima.

Resum: Es van elaborar pel·lícules comestibles utilitzant midó de creïlla (PS), lactoferrina (LF), lisozima (LZ) i glicerol (G) com a plastificant en diferents proporcions. Es van caracteritzar les propietats físiques, comportament tèrmic i bioactivitat de les pel·lícules comestibles (propietats òptiques, mecàniques, microestructurals, humitat d'equilibri, permeabilitat al vapor d'aigua, temperatura de transició vítrea (Tg) i termo-degradació, activitat antimicrobiana i antioxidant) havent transcorregut una i cinc setmanes d'emmagatzemament condicionades a 25°C-53% HR. La incorporació de proteïnes a la matriu de midó va afectar de forma significativa a les propietats mecàniques, barrera i òptiques, donant lloc a pel·lícules amb un descens generalitzat de la rigidesa, així com de la seua resistència a la fractura i extensibilitat, amb una permeabilitat al vapor d'aigua reduïda, menors valor de lluminositat i un color més saturat. La microestructura de les pel·lícules va reflectir falta de compatibilitat entre el midó i les proteïnes, encara que l'increment de la Tg del midó amb la incorporació de proteïnes suggereix cert nivell de miscibilitat. Es va observar activitat antimicrobiana sols per al cas de la combinació de ambdues

proteïnes front la soca *E.coli*. Les proteïnes van presentar activitat antioxidant.

Paraules clau: pel·lícules comestibles, midó de creïlla, lactoferrina, lisozima.

Abstract: Edible films were prepared using potato starch (PS), lactoferrin (LF), lysozyme (LZ) and glycerol (G) as a plasticizer in various proportions. The physical properties, thermal behavior and bioactivity of edible films (optical, mechanical, microstructural, equilibrium moisture, water vapor permeability, the glass transition temperature (Tg) and thermal degradation, antimicrobial and antioxidative activity) were characterized after one to five weeks of storage, conditioned at 25 ° C-53% RH. The addition of protein to the starch matrix significantly affect the mechanical, optical and barrier properties, resulting in films with an overall decrease in stiffness, and its tensile strength and extensibility; with reduced permeability to water vapor, lower values of the brightness and a more saturated color. The microstructure of the films reflecting the lack of compatibility between starch and proteins, although the increase in the Tg of starch with the addition of protein suggesting some degree of miscibility. Antimicrobial activity was observed only for the combination of both proteins from *E. coli* strain. The proteins showed antioxidant activity.

Keywords: edible films, potato starch, lactoferrin, lysozyme.

1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos derivados del petróleo han sido utilizados desde la década de los 40, según la Environmental Protección Agency (EPA). La acumulación de plástico no biodegradable supone un importante problema medioambiental que ha sido ineficientemente abordado (Azeredo, 2009). Debido a este grave problema, en los últimos años se investiga cada vez más en el desarrollo de polímeros biodegradables a partir de recursos renovables de diferentes orígenes (animal, vegetal o microbiológico). Éstos, además pueden aportar ventajas como materiales funcionales, por poder actuar como soporte de agentes antioxidantes y antimicrobianos (Sánchez-García et al., 2008). El uso de materiales biodegradables como películas o recubrimientos comestibles está aumentando, ya que estos materiales degradables no contribuyen a la contaminación ambiental (Chen et al., 2008, Mehvar and Han, 2004).

Una película o recubrimiento comestible es una delgada capa de material que cubre la superficie del alimento (aplicada mediante inmersión, pulverización o pintado) o bien una envoltura continua que separa distintos componentes alimenticios, que puede ser consumida como parte del producto y aumentar su vida útil (Guilbert, 1986; Gennadios y Weller, 1990). Los polisacáridos, las proteínas y las grasas, son los materiales más empleados para su fabricación (Falguera et al., 2011), y dentro del grupo de los polisacáridos, el uso de almidón, es uno de los más destacados.

El almidón es un polisacárido compuesto por amilosa y amilopectina (Talja et al., 2007). Se trata de un recurso renovable, de bajo coste, fácil

accesibilidad y gran disponibilidad, por lo que tiene gran importancia en la producción de envases biodegradables (Dole et al., 2004; Liu 2005). El almidón nativo, previo tratamiento con plastificantes bajo calentamiento, adquiere propiedades termoplásticas similares a las de los polímeros sintéticos comunes.

La adición de proteínas procedentes del suero lácteo, tales como la lactoferrina y la lisozima, resulta una opción interesante para conferir propiedades bioactivas a las películas comestibles (Jenssen and Hancock, 2009). La lactoferrina es una glicoproteína con una gran afinidad por el hierro y presente en fluidos biológicos, como la leche de vaca (Farnaud and Evans, 2003; Jenssen and Hancock, 2009; Abril et al, 2012). Esta enzima muestra actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias, hongos, levaduras y virus (Drago, 2006). La lisozima es una de las enzimas antimicrobianas más frecuentemente incorporada en materiales de envase. Es activa principalmente contra bacterias Gram-positivas mediante la fractura de los puntos de unión entre el ácido N-acetilmurámico y el N-acetilglucosamina del peptidoglicano de las paredes celulares de las bacterias (Güçbilmez et al, 2007). Por otro lado, la lisozima no ejerce efecto sobre las bacterias Gram-negativas debido a la presencia de una membrana protectora alrededor del peptidoglicano, por lo que sería necesario combinarlo con otros compuestos que permitieran ampliar su espectro de acción, como detergentes o quelantes que desestabilicen dicha membrana (Gill & Holley, 2000; Branen & Davidson, 2004; Padgett et al., 1998).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la incorporación de lactoferrina y/o lisozima en las propiedades físicas y el comportamiento térmicas de películas elaboradas a base de almidón de patata. Además se analizó la capacidad antimicrobiana y antioxidante de ambas proteínas y su mezcla.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Para la obtención de las películas se utilizó almidón de patata (PS), de contenido en amilosa 17,9%; suministrado por Roquette Laisa España, S.A. (Lestrem cedex, France); lactoferrina bovina liofilizada (LF) suministrada por ABIAL Tecnología e Innovación S.L., lisozima (LZ) suministrada por DSM Food Specialties B.V. y como plastificante, se utilizó glicerol (G) suministrado por Panreac Química S.A. (Castellar de Vallès, Barcelona, España).

Para el acondicionamiento de las películas se utilizó nitrato de magnesio o pentóxido de fósforo, suministrados por (Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España).

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó, TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ABTS (ácido 2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) y persulfato potásico suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizó Tryptic Soy Broth (TSB), Violet Red Blue Agar (VRB AGAR), Palcam Agar Base,

Buffered Peptone Water y Agar Bacteriological; todos ellos suministrados por Panreac Química S.A. (Castellar de Vallès, Barcelona, España). Los cultivos de *L. innocua* y *E. coli* fueron obtenidos a partir de liófilos suministrados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, Valencia).

2.2. Diseño y obtención de los films

2.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se prepararon siete formulaciones distintas a base de PS al 2% (g/100g disolución), glicerol en una proporción másica respecto al almidón de 1:0,25 y distintas cantidades de disolución de lactoferrina y lisozima al 10% (0,1 y 0,2 % de proteína de cada proteína o su mezcla respecto al almidón) tal y como se muestra en la TABLA 1.

TABLA 1. Nomenclatura y proporción de componentes de cada formulación

FORMULACIÓN	PS (g)	LF(g)	LZ(g)
PS ₁ :LF ₀ :LZ ₀	1	0	0
PS ₁ :LF _{0.1} :LZ ₀	1	0.1	0
PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.1}	1	0	0.1
PS ₁ :LF _{0.05} :LZ _{0.05}	1	0.05	0.05
PS ₁ :LF _{0.2} :LZ ₀	1	0.2	0
PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.2}	1	0	0.2
PS ₁ :LF _{0.1} :LZ _{0.1}	1	0.1	0.1

Se prepararon dispersiones de almidón mediante agitación magnética (5-10 minutos). Éstas se introdujeron en un baño termostataado a 99°C durante 30 minutos para su gelatinización, agitándose con espátula cada 5 minutos. Se enfriaron con agua durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos, se añadió el glicerol, se mezcló con un homogenizador rotor-estator ultraturax D125 a 13500rpm durante 4 minutos y se desgasificó. Por otra parte, se prepararon las disoluciones acuosas de proteína por agitación magnética a 800rpm durante 20 minutos, y se desgasificaron a vacío. Finalmente, se añadió la cantidad necesaria de la disolución de proteína a cada formulación, se agitó magnéticamente y se desgasificó.

2.2.2. OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS

Se utilizaron placas de teflón de 150 mm de diámetro. En cada placa se vertió la cantidad de formulación necesaria para obtener una masa constante de sólidos por placa (55.5g). Las muestras se dejaron secar durante 48 horas al 45 (± 1) %HR y 25 (± 1) °C. Tras el secado, las películas se despegaron de las placas y se almacenaron en desecadores a 53 % HR y 25°C, durante 1 y 5 semanas, o con P₂O₅, previamente a la realización de los análisis.

2.3. Caracterización física y térmica de las películas

2.3.1. MICROESTRUCTURA

Se obtuvieron micrografías transversales y superficiales de las películas por microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un microscopio JEOL®, modelo JSM-5410. Las películas fueron previamente almacenadas en un desecador con P_2O_5 . Se cortaron muestras rectangulares de 5x2mm aproximadamente, se criofracturaron por inmersión en nitrógeno líquido, se montaron en un soporte de cobre y se cubrieron con oro, con el fin de hacerlas conductoras. El voltaje utilizado fue de 10KV.

2.3.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882. Para cada formulación se cortaron 12 muestras (25 mm por 100 mm). Se determinó el espesor en cuatro puntos con un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). Las muestras se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación fueron de 50mm y $50\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Las curvas de fuerza frente a distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ) frente a deformación de Henky (ϵ_H). Se obtuvieron los parámetros EM (módulo de elasticidad, MPa) TS (tensión de fractura, MPa) y %E (deformación en el punto de fractura).

2.3.3. HUMEDAD DE EQUILIBRIO Y PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La humedad de las películas equilibradas a 53% HR se determinó con un método gravimétrico. Se eliminó la humedad por desecación en estufa (60°C - 24h) seguida de almacenamiento en desecadores con P_2O_5 . Los análisis se realizaron por quintuplicado.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para un gradiente de HR 53-100%. Se cortaron seis muestras circulares de 3,5cm de diámetro por formulación, se determinó el espesor en seis puntos con un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). Las muestras se acoplaron sobre copas de aluminio (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se había depositado 5ml de agua destilada (HR 100%). La cara de la película en contacto con el aire durante el secado se colocó hacia el exterior de la copa. Para asegurar la hermeticidad, 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 con disolución saturada de nitrato de magnesio (53% HR). Los

deseCADadores se almacenaron a 25°C en una camara Hotcold UL (Selecta), y se monitorizo la masa con una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 horas durante 24h.

2.3.4. PROPIEDADES ÓPTICAS: TRANSPARENCIA, COLOR Y BRILLO

Se utilizo un espectrocolormetro Minolta modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo) para obtener los espectros de reflexión de las películas sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R_0) entre 400 y 700nm, así como el espectro del fondo blanco (R_g). A partir de éstos, se calcularon los espectros de transmitancia interna (como indicador de la transparencia) y R_∞ (reflectancia de una lámina infinita de muestra cuyo grosor fuera suficiente como para anular el efecto del fondo), utilizando la teoría de Kubelka - Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999). Se analizaron seis muestras por formulación, y se tomaron tres medidas por muestra. Las mediciones se realizaron sobre la cara que había estado en contacto con el aire durante el secado.

A partir de los espectros de R_∞ , se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIE- $L^*a^*b^*$ (CIE, 1986), utilizando como sistema de referencia observador 10° e iluminante D65. El tono (h_{ab}^*), el croma (C_{ab}^*) y el índice de blancura (WI) se calcularon según Atarés et al. (2010).

El brillo se midio con un brillmetro Multi.Gloss 268 (Minolta, Alemania) a 60° con respecto a la normal. Las muestras se colocaron sobre una superficie de color negro mate, de acuerdo con la norma ASTM D523 (ASTM, 1999). Se realizaron diez mediciones por formulación y ángulo, en la cara de la película que había estado en contacto con el aire durante el secado. Las medidas se expresaron en unidades de brillo relativas a una superficie de vidrio negro con un valor próximo a 100.

2.3.5. ANÁLISIS TÉRMICO (DSC)

Con el fin de determinar la temperatura de transición vítreas (T_g), las muestras de películas acondicionadas en deseCADadores con P_2O_5 fueron sometidas a ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo TA Instruments modelo DSC1 STAR^e System (Mettler Toledo) con un caudal de ntrgeno a 50 mL/min. Se pesaron unos 10 mg (± 1 mg) de película previamente triturada y se sellaron en crisoles de aluminio (previamente pesados, para cuantificar la pérdida de agua durante el calentamiento de las muestras), tomando como referencia un crisol vacío. Se sometieron a un primer ciclo de calentamiento de 0°C a 160°C a 50 °C/min, una segunda etapa de enfriamiento hasta 0°C y un ciclo final de calentamiento hasta 200°C a 10°C/min. Se anoto el peso de la muestra tras el análisis para conocer la pérdida de masa. Las medidas se hicieron por duplicado.

2.3.6. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Se obtuvieron datos del análisis termogravimétrico, TGA, en un analizador térmico Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e (Schwarzenbach, Suiza), con la finalidad de estudiar la estabilidad térmica de las películas. Muestras de unos 3 mg de películas previamente trituradas fueron calentadas gradualmente a 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 600 °C bajo atmósfera de nitrógeno (50 mL/min). Se tomó como la temperatura inicial de degradación (T_0) aquella a la que la muestra perdía un 5% de su masa inicial, mientras que la temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) correspondió al pico obtenido en la gráfica de la 1ª derivada.

2.4. Caracterización de la bioactividad de las proteínas

2.4.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se analizó la capacidad antimicrobiana de las proteínas frente a *Listeria innocua* y *E. coli*. Las cepas conservadas a -25°C en TSB complementado con 30% de glicerol, fueron regeneradas sembrando un asa en 10ml de medio de cultivo (TSB). Tras un periodo de incubación de 24h a 37°C, se transfirió 10 µl de este primer cultivo a 10ml de TSB e incubándolo a 37°C durante 24 horas. Una dilución de este cultivo será utilizada para el posterior ensayo de evaluación de la actividad antimicrobiana de la lactoferrina y lisozima. La metodología utilizada es una adaptación del artículo de Kristo et al (2008). Se vertieron alícuotas de TSANaCl (10mL) en miniplacas Petri. Una vez solidificado el medio de cultivo, se inocularon las placas en superficie con una dilución del cultivo de trabajo (34µL) de *L. innocua* o *E. coli* (10^2 UFC/cm²). Posteriormente se depositó 1mL de la disolución de proteína (2,6%) en la superficie inoculada, y se dejó secar durante una hora. Como control del ensayo se utilizó TSANaCl inoculado. Las placas fueron selladas con parafilm para evitar la deshidratación.

Para realizar los recuentos, el agar fue retirado de las miniplacas Petri en condiciones de esterilidad e introducido en bolsas de Stomacher. En cada bolsa, se añadieron 90mL de agua de peptona. Se agitó durante 2 minutos en un Stomacher (Bag Mixer 400, Interscience), y cada muestra de 1mL fue sembrada en profundidad con VRB Agar en el caso de *L. innocua* y Palcam Agar Base para *E. coli*. Tras un periodo de incubación de 24 horas a 37°C, las colonias fueron contadas. Los ensayos se realizaron por duplicado a dos tiempos (0 y 24h) y dos temperaturas (10°C y 25°C), para ambos microorganismos.

2.4.2 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó con un método espectrofotométrico (Re et al., 1998) basado en el uso de un patrón antioxidante, el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- carboxílico). Como sustrato se utilizó ABTS (ácido 2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) previamente oxidado al radical

catiónico ABTS^{•+}, de coloración azul. Se preparó una disolución acuosa de ABTS (7 mM) y peroxodisulfato potásico (2.45 mM), que permaneció en oscuridad durante unas 16h, obteniéndose el radical catiónico coloreado. Se diluyó en etanol hasta una absorbancia inicial (A_0) de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734nm. Todas las determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 730, England), utilizando etanol como blanco, y a esa misma longitud de onda. Para preparar las muestras de proteína, se mezclaron 0.5g de muestra, de humedad conocida, con 10 ml de agua bidestilada y se agitó a 250 rpm durante 24h. Antes de la medición, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10min a 4°C. Las muestras (10 μ l) se mezclaron con la dilución de ABTS^{•+} (990 μ l) y se registró el valor de la absorbancia a los 6 minutos (A_6). Se realizaron tres repeticiones por determinación. Se determinó el porcentaje de reducción de la absorbancia.

Se repitió el procedimiento con diferentes diluciones de trolox como agente antioxidante (0mg/l hasta 600mg/l), para obtener una recta de calibrado que relacionara el porcentaje de reducción de A con la concentración de agente antioxidante presente a los 6 minutos. La capacidad antioxidante en TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) se definió como la cantidad de muestra necesaria para obtener la misma reducción de absorbancia que producen 10 μ l de disolución de trolox de concentración 300mg/l.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. II. Para discernir entre las medias, se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización física y térmica de las películas

3.1.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Las FIGURAS 1 y 2 muestran, respectivamente, imágenes obtenidas por SEM de la sección transversal y de la superficie de las películas tras una semana de almacenamiento.

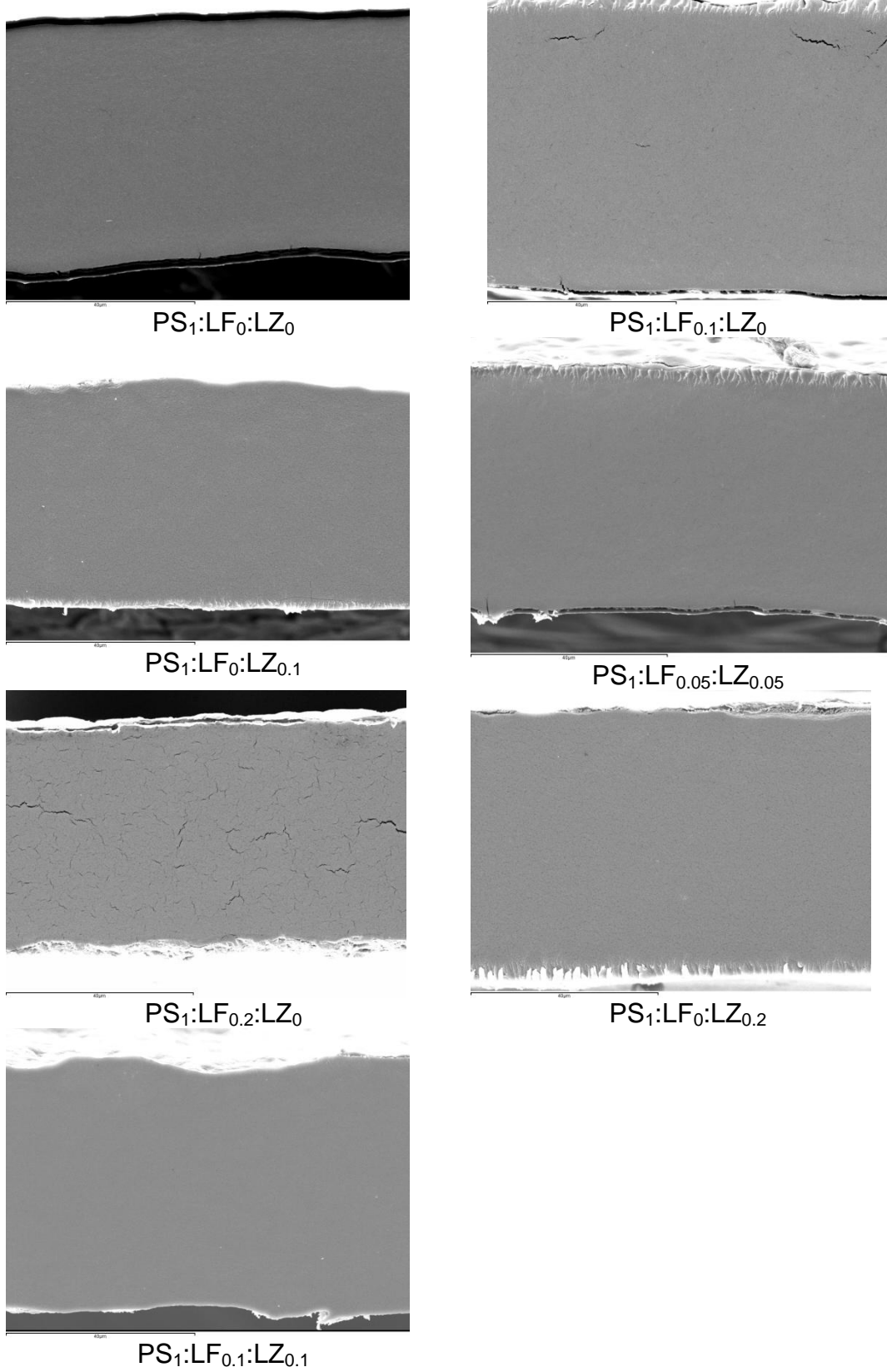


FIGURA 1. Micrográficas por SEM de la sección transversal de las películas equilibradas con P₂O₅ a 25 °C.

Para las películas sin proteína ($PS_1:LF_0:LZ_0$) se observó una estructura homogénea, compacta y sin presencia de poros. La incorporación de proteínas dio lugar a la formación de estructuras de mayor heterogeneidad, como resultado de la incompatibilidad parcial de ambas proteínas con el almidón. Esta miscibilidad parcial provocó el cremado durante el secado del film de parte de la proteína (por su menor densidad respecto al almidón), reduciéndose su nivel de dispersión con la matriz de almidón. En consecuencia, se observa la formación de irregularidades en la superficie de las películas (FIGURA 2), con formaciones globulares asociadas a la fracción proteica. La fracción de proteína que permaneció integrada con el PS en el seno de la película generó interrupciones de la matriz continua de almidón, facilitándose la aparición de microfracturas en la estructura. Esta fragilidad, tuvo mayor notoriedad en las películas con LF, especialmente para aquella formulación con mayor proporción ($PS_1:LF_{0.2}:LZ_0$), lo que podría indicar una menor compatibilidad de esta proteína con el polisacárido. La adición de una mayor proporción de proteína, en el caso de las formulaciones $PS_1:LF_0:LZ_{0.2}$ y $PS_1:LF_{0.1}:LZ_{0.1}$, no dio lugar a tantas microfracturas lo indica una mayor integración en la fase continua de almidón. Por otro lado, la mayor compatibilidad de la LZ respecto a la LF reduce la heterogeneidad de la matriz de aquellas formulaciones que poseen una mezcla de ambas proteínas ($PS_1:LF_{0.05}:LZ_{0.05}$, $PS_1:LF_{0.1}:LZ_{0.1}$).

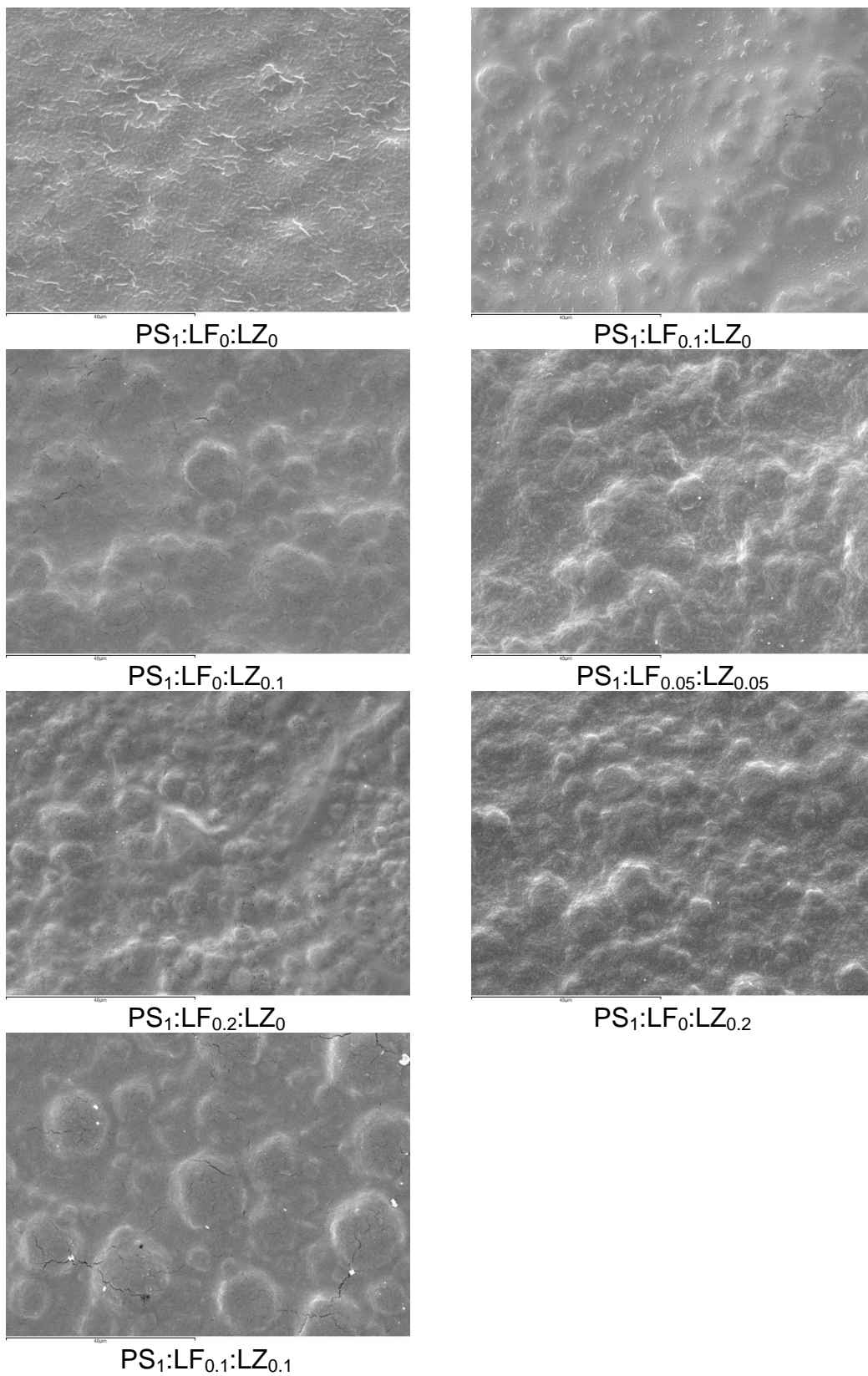


FIGURA 2. Micrografías por SEM de la superficie de las películas equilibradas con P₂O₅ a 25 °C.

3.1.2. PROPIEDADES MECÁNICAS, HUMEDAD DE EQUILIBRIO Y PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La TABLA 2 presenta las propiedades mecánicas de las películas que se estudiaron a través de la cuantificación de tres parámetros: módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y extensibilidad (%E), así como los valores de la humedad de equilibrio (g agua/ g película seca) y permeabilidad al vapor de agua (WVP).

TABLA 2. Resultados de espesor, parámetros mecánicos (EM, TS y %E), humedad de equilibrio (g agua/ g película seca) y permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas, tras 1 y 5 semanas de almacenamiento.

	Espesor (mm)	EM (MPa)	TS (MPa)	%E	X _w (b.s.)	WVP (g/Pa s m)x10 ⁷	
SEMANA 1	PS ₁ :LF ₀ :LZ ₀	0,059 (0,005) ^a	1350 (143) ^{de}	36,6 (5,8) ^e	4,5 (0,6) ^d	6,13 (0,09) ^c	6,3 (0,9) ^c
	PS ₁ :LF _{0.1} :LZ ₀	0,061 (0,004) ^a	1446 (129) ^e	27,2 (5,7) ^{cd}	2,2 (0,6) ^b	4,6 (0,6) ^a	6,5 (0,4) ^{bc}
	PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.1}	0,080 (0,005) ^d	1197 (125) ^{bc}	22,3 (6,5) ^b	2,3 (0,6) ^b	5,02 (0,54) ^{ab}	6,2 (0,3) ^{ab}
	PS ₁ :LF _{0.05} :LZ _{0.05}	0,073 (0,005) ^b	1296 (81) ^{cd}	22,1 (4,3) ^b	2,106 (0,532) ^b	5,3 (0,5) ^b	6,2 (0,5) ^{ab}
	PS ₁ :LF _{0.2} :LZ ₀	0,079 (0,006) ^d	1015 (333) ^a	4,94 (2,05) ^a	0,8 (0,3) ^a	4,6 (0,5) ^a	5,8 (0,3) ^a
	PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.2}	0,072 (0,005) ^b	1169 (85) ^b	30,02 (3,52) ^d	3,2 (0,6) ^c	4,995 (0,509) ^{ab}	5,8 (0,4) ^a
	PS ₁ :LF _{0.1} :LZ _{0.1}	0,075 (0,004) ^c	1176 (60) ^b	25 (5) ^{bc}	2,5 (0,6) ^b	5,6 (0,4) ^b	6,5 (0,2) ^{bc}
SEMANA 5	PS ₁ :LF ₀ :LZ ₀	0,063 (0,002) ^a	1344 (71) ^d	35 (4) ^f	4,5 (0,8) ^d	5,9 (0,4) ^a	6,9 (1,6) ^b
	PS ₁ :LF _{0.1} :LZ ₀	0,072 (0,013) ^b	1166 (121) ^c	19,9 (6,4) ^{de}	2,3 (0,9) ^c	6,9 (0,5) ^{bc}	6,5 (0,5) ^a
	PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.1}	0,084 (0,003) ^e	761 (47) ^a	15,9 (2,1) ^c	2,6 (0,4) ^c	7,2 (0,3) ^{cd}	6,03 (0,62) ^a
	PS ₁ :LF _{0.05} :LZ _{0.05}	0,079 (0,002) ^e	825 (58) ^a	16,46 (2,14) ^{cd}	2,5 (0,3) ^c	7,6 (0,3) ^d	6,3 (0,8) ^a
	PS ₁ :LF _{0.2} :LZ ₀	0,079 (0,012) ^d	956 (296) ^b	5,48 (3,03) ^a	0,7 (0,2) ^a	6,3 (0,6) ^{ab}	6,40 (1,09) ^a
	PS ₁ :LF ₀ :LZ _{0.2}	0,07 (0,02) ^c	955 (189) ^b	11,8 (6,6) ^b	1,3 (0,5) ^b	6,6 (0,6) ^{bc}	5,7 (0,3) ^a
	PS ₁ :LF _{0.1} :LZ _{0.1}	0,072 (0,004) ^b	1116 (51) ^c	22,63 (3,04) ^e	2,2 (0,4) ^c	8,5 (0,6) ^e	5,6 (0,4) ^a

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas (p>0.05).

Los valores obtenidos para las propiedades mecánicas de las películas de almidón sin proteína fueron similares a los obtenidos por otros autores (Chen et al., 2008, Phan The et al., 2009, Da Matta et al., 2011, Souza et al., 2011). La adición de proteínas supuso un descenso generalizado de la rigidez de las películas, así como de su resistencia a la fractura y de su extensibilidad para ambos tiempos de almacenamiento. Este empeoramiento

de las propiedades mecánicas estaría ligado a la heterogeneidad que implica la presencia de las proteínas en la formulación, puesto que éstas se mezclan parcialmente con la matriz de almidón de patata, interrumpiendo su continuidad. Después de 5 semanas de almacenamiento se observó una reducción en la rigidez y resistencia de las películas con proteína, tal como se ha observado para films de almidón de maíz y caseinato sódico (Jimenez et al. 2012a).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) es una propiedad importante ya que está directamente relacionada con la capacidad de las películas para frenar el transporte de vapor de agua cuando se aplican a alimentos. Según Ma et al. (2008), debe ser lo más baja posible para evitar la transferencia de agua. La permeabilidad al vapor de agua de las películas sin proteína ($PS_1:LF_0:LZ_0$) fue del orden de los obtenidos por otros autores (Han et al., 2006, Ma et al., 2008). Los valores de WVP vieron ligeramente reducidos al adicionar las proteínas, tanto más cuanto mayor fue la proporción de las mismas. Este efecto puede estar vinculado con las interacciones específicas almidón proteína que tienen lugar en la película durante el proceso de secado, posiblemente en combinación con la acumulación de proteína en la cara superior de las películas formando una monocapa en la superficie del film que contribuye a frenar el transporte de agua.

3.1.3. PROPIEDADES OPTICAS: TRANSPARENCIA, COLOR Y BRILLO

La FIGURA 3 muestra los espectros de transmitancia interna (T_i) entre 400 y 700nm de las películas, como indicador de su nivel de transparencia. La TABLA 3 muestra los resultados de los parámetros ópticos de las películas (luminosidad, croma, tono e índice de blancura), así como el brillo a 60° , para ambos tiempos de almacenamiento.

La incorporación de proteínas tuvo como consecuencia la reducción de la transmitancia interna de las películas. La disminución más relevante tuvo lugar al aumentar el contenido en LF, principalmente a bajas longitudes de onda, lo que refleja un aumento en la opacidad de las películas. Esto es coherente con la formación de una estructura heterogénea y con cambios en el índice de refracción a través de las mismas. Cuanto mayor fue la proporción de proteína adicionada, mayor fue la dispersión de luz, con la consiguiente pérdida de transparencia. La transmitancia interna disminuyó al aumentar el contenido en LZ. Sin embargo, esta disminución fue menos severa que con lactoferrina, que presenta una mayor absorción específica entre 400-500 nm, lo cual contribuye a la coloración del film.

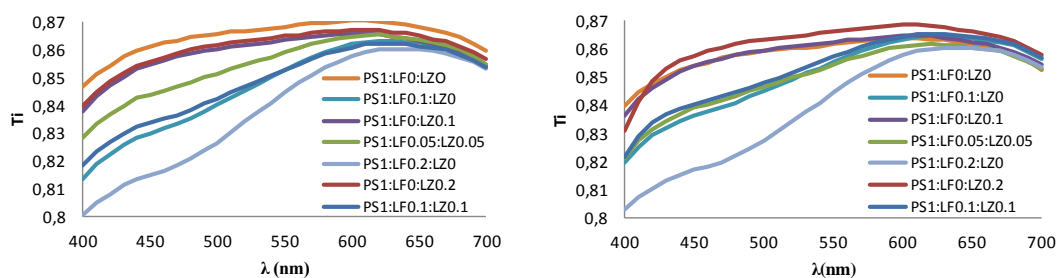


FIGURA 3. Distribución espectral de la transmitancia interna (T_i) para cada formulación, a la semana 1 y 5, respectivamente, de almacenamiento.

TABLA 3. Resultados de los parámetros ópticos de las películas (luminosidad, croma, tono e índice de blancura) y brillo a 60° , para ambos tiempos de almacenamiento.

	L^*	C_{ab}^*	h_{ab}^*	WI	Brillo (60°)	
SEMANA 1	$PS_1:LF_0:LZ_0$	84,6 (0,4) ^e	1,2 (0,5) ^a	286 (6) ^b	84,5 (0,5) ^f	23 (2) ^d
	$PS_1:LF_{0.1}:LZ_0$	77,3 (0,2) ^a	8,3 (0,6) ^d	63,8 (0,5) ^a	75,8 (0,3) ^b	7,96 (0,94) ^a
	$PS_1:LF_0:LZ_{0.1}$	83,1 (0,6) ^d	1,4 (0,5) ^a	307,57 (17,03) ^c	83,02 (0,59) ^e	8,4 (0,7) ^a
	$PS_1:LF_{0.05}:LZ_{0.05}$	80,8 (0,9) ^c	5,2 (0,8) ^b	67,13 (1,08) ^a	80,06 (0,72) ^d	8,5 (0,8) ^a
	$PS_1:LF_{0.2}:LZ_0$	76,4 (0,3) ^a	11,3 (1,2) ^e	59,0 (0,6) ^a	73,9 (0,7) ^a	8,3 (0,7) ^a
	$PS_1:LF_0:LZ_{0.2}$	84,2 (0,9) ^e	1,6 (0,7) ^a	210 (13) ^c	84,1 (0,9) ^f	10,1 (0,6) ^c
	$PS_1:LF_{0.1}:LZ_{0.1}$	79,3 (1,3) ^b	6,8 (0,6) ^c	59,2 (1,3) ^a	78,15 (1,03) ^c	9,4 (0,7) ^b
SEMANA 5	$PS_1:LF_0:LZ_0$	84 (2) ^d	1,005 (0,424) ^a	298,523 (10,107) ^b	84 (2) ^d	15 (3) ^d
	$PS_1:LF_{0.1}:LZ_0$	79,6 (1,8) ^b	7,6 (0,4) ^e	63,42 (1,08) ^a	78 (2) ^b	10,04 (1,02) ^c
	$PS_1:LF_0:LZ_{0.1}$	82,008 (1,148) ^c	1,2 (0,3) ^a	307,9 (10,5) ^c	81,97 (1,13) ^c	8,8 (0,7) ^{ab}
	$PS_1:LF_{0.05}:LZ_{0.05}$	79,2 (0,6) ^b	4,7 (0,3) ^c	63,92 (1,12) ^a	78,7 (0,5) ^b	8,4 (0,8) ^a
	$PS_1:LF_{0.2}:LZ_0$	75,8 (0,5) ^a	10,4 (0,3) ^f	57,4 (0,2) ^a	73,6 (0,4) ^a	8,6 (0,7) ^a
	$PS_1:LF_0:LZ_{0.2}$	84,82(1,13) ^d	2,02 (0,49) ^b	292(5) ^b	84,68 (1,05) ^d	9,6 (0,6) ^{bc}
	$PS_1:LF_{0.1}:LZ_{0.1}$	80,4(1,5) ^b	6,4(0,8) ^d	60,4(1,4) ^a	79,3 (1,2) ^b	9,2 (0,5) ^{ab}

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

La adición de proteínas supuso una cierta reducción de la luminosidad de las películas para ambos tiempos de almacenamiento, sin un efecto relevante de la proporción de proteína adicionada. La incorporación de lactoferrina tuvo un efecto importante sobre el valor del croma y el tono, con el consiguiente aumento significativo de ambos, debido a su absorción específica a bajas longitudes de onda. Coherentemente, las películas con

mezcla de proteínas mostraron también mayor pureza de color y tonos más rojizos. Con el aumento de la pureza de color, el índice de blancura presentó valores más reducidos al incorporarse proteínas a las películas.

Todas las películas presentaron valores de brillo bajos, por lo que podrían calificarse como mate. Para ambos tiempos de almacenamiento se observó una cierta reducción del brillo al adicionarse proteínas, en coherencia con la mayor heterogeneidad de la superficie de las películas, tal como se observa por SEM, que causaría una reflexión especular más difusa. Los films con proteínas no presentaron cambios de brillo durante el almacenamiento, pero el film de almidón fue menos brillante a las 5 semanas, tal como han observado otros autores en films de diferentes tipos de almidón (Jimenez et al. 2012b; Cano et al. 2014) y que han atribuido a la re-cristalización del almidón en la superficie del film donde es mayor la humectación y la ganancia de movilidad molecular.

3.1.4. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA: DSC Y TGA

La TABLA 4 muestra los resultados obtenidos para las propiedades térmicas analizadas por DSC (T_g) y TGA (T inicial de degradación y T de máxima velocidad de degradación).

TABLA 4. Resultados obtenidos para las propiedades térmicas analizadas por DSC (T_g) y TGA (T inicial de degradación y T de máxima velocidad de degradación).

	T_g (°C)	T_0 (°C)	T_{max} (°C)
PS₁:LF₀:LZ₀	125,9 (0,2) ^a	283,0 (0,8) ^c	310,8 (0,6) ^{cd}
PS₁:LF_{0,1}:LZ₀	129,62 (1,07) ^b	280,5 (0,8) ^c	301 (12) ^c
PS₁:LF₀:LZ_{0,1}	153,2 (0,9) ^c	267,6 (0,3) ^a	277,8 (0,8) ^a
PS₁:LF_{0,05}:LZ_{0,05}	138,6 (0,7) ^c	272,0 (0,3) ^b	289,8 (0,5) ^b
PS₁:LF_{0,2}:LZ₀	138,9 (1,1) ^c	288 (2) ^d	315 (2) ^d
PS₁:LF₀:LZ_{0,2}	161,8 (0,2) ^d	265,5 (0,9) ^a	276,9 (0,6) ^a
PS₁:LF_{0,1}:LZ_{0,1}	154,6 (1,5) ^c	271,4 (0,7) ^b	285,8 (0,4) ^{ab}

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

Los valores de T_g obtenidos para la formulación sin proteína son del orden a los reportados por Farahnaky et al. (2009). La incorporación al sistema de un 10 y 20 % respecto al PS de LF y LZ, dio lugar a un aumento significativo ($p < 0.05$) de T_g . A mayor concentración de proteína, mayor valor incremento y además este fue mayor para la LZ, cuyo peso molecular es ligeramente mayor que el de la LF (14,3 frente a 14,2 kDaltons). Este comportamiento podría ser debido a que una fracción de la proteína interacciona con las cadenas de almidón, dando lugar a la formación de complejos de mayor tamaño molecular que presentan una mayor temperatura de transición vítrea. En el caso de las películas con mezcla de proteínas y para ambas proporciones ensayadas, la T_g tomó valores comprendidos entre los obtenidos para los films con cada una de las

proteínas por separado, lo cual sugiere la miscibilidad de ambos complejos con las cadenas de almidón.

La temperatura de máxima velocidad de degradación de las películas sin proteína fue 310.8 °C, de acuerdo con los resultados obtenidos por He et al. (2012). La adición de proteína generó una reducción en la temperatura de inicio de degradación (T_0), como consecuencia de la menor resistencia térmica de las proteínas en comparación con la del almidón (TABLA 4). En la FIGURA 4 se observa la pérdida de masa de cada una de las formulaciones asociada al calentamiento de las muestras. La primera etapa de pérdida de peso, hasta 100 °C, corresponde a la pérdida de la humedad presente en las películas y dio lugar a una pérdida de masa en torno al 6%, coherentemente con los valores de humedad de equilibrio de los films. La segunda etapa corresponde a la degradación de los componentes de la película que se inicia entre 265 y 283 °C, dependiendo de la composición del film.

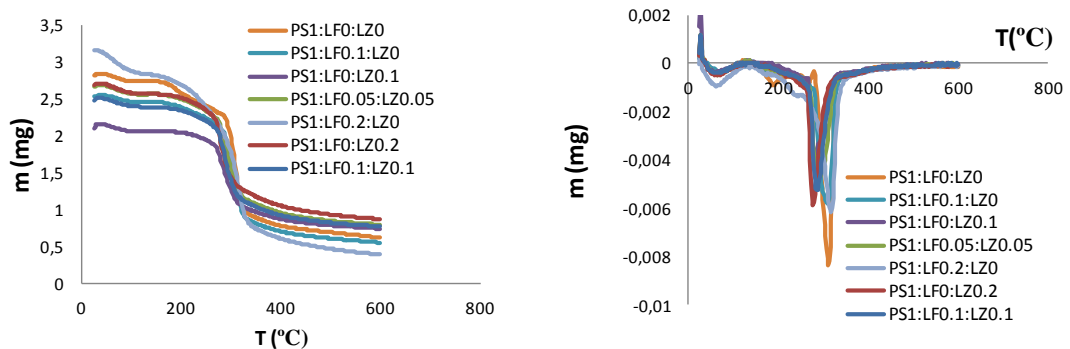


FIGURA 4. Curva de disminución de la masa frente a la temperatura (izquierda) y su primera derivada (derecha), para cada formulación.

3.2. Caracterización de la bioactividad de las proteínas

3.2.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las FIGURAS 5 y 6 muestran, respectivamente, los resultados de los ensayos de capacidad antimicrobiana de ambas proteínas sobre *L. innocua* y *E. coli* a 10 y 25°C de almacenamiento.

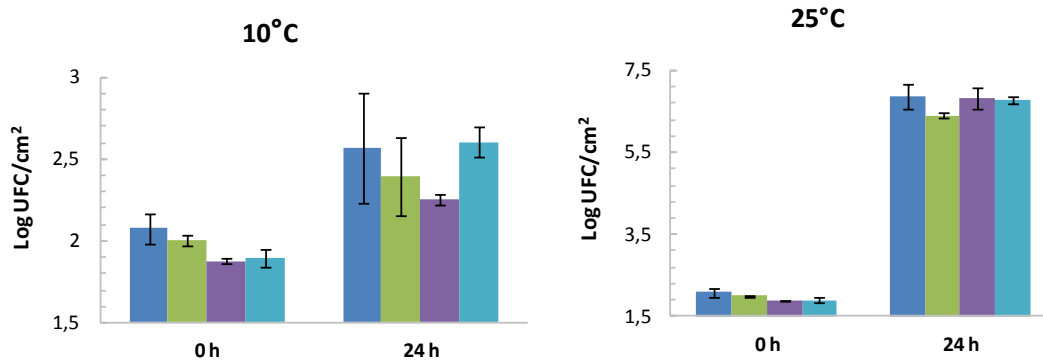


Figura 5. Resultados de los ensayos de capacidad antimicrobiana frente a *L. innocua* para temperaturas de incubación de 10 y 25°C: control (—); LF (—); LZ (—); LF-LZ (—).

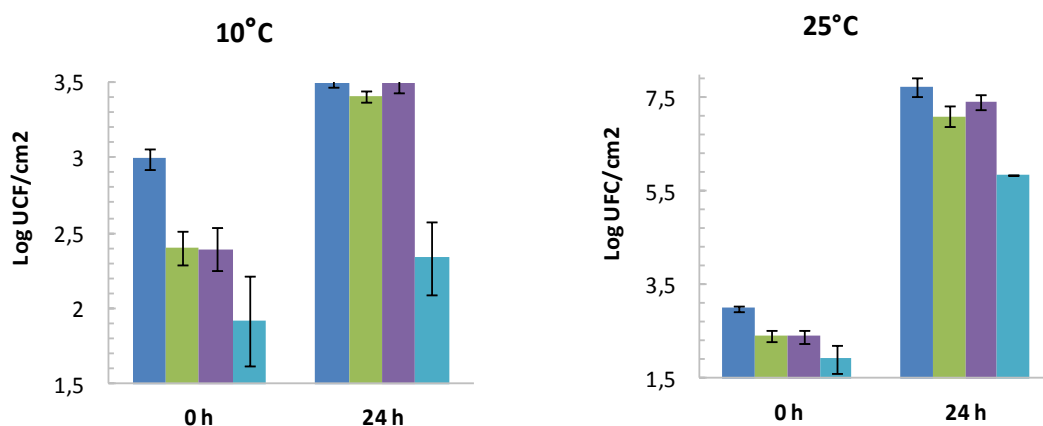


Figura 6. Resultados de los ensayos de capacidad antimicrobiana frente a *E. coli* para temperaturas de incubación de 10 y 25°C: control (—); LF (—); LZ (—); LF-LZ (—).

Para ambas bacterias se observó un descenso de la población al inicio del almacenamiento en comparación con el control, que fue más acusado para la mezcla de ambas proteínas.

Para *L. innocua* (FIGURA 5) no se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento del control y las muestras de proteína. Por lo tanto, para esta cepa en concreto ni las proteínas por separado ni conjuntamente presentaron actividad antimicrobiana. Sin embargo, en el caso de *E. coli* (FIGURA 6) a tiempo 0h se observó una diferencia notable en el crecimiento entre las muestras con proteína y el control, siendo esta diferencia de 1 logaritmos para la mezcla de LF y LZ. Tras 24h, se observó una diferencia de crecimiento de 1.2 y 1.9 logaritmos a 10 y 25°C respectivamente, para la mezcla de ambas proteínas. Este comportamiento revela cierta acción bactericida inicial acompañada de una acción bacteriostática con el tiempo,

que limita el crecimiento de *E. coli* durante las 24h de incubación. Aunque ninguna de las dos proteínas mostró actividad antibacteriana contra la cepa de *E. coli*, la combinación de ambas dio lugar a una acción sinérgica. El mecanismo de acción de esta combinación de enzimas se explicaría por la desestabilización de la membrana de *E. coli* por parte de la lactoferrina, permitiéndose el acceso de la lisozima a la pared celular de la bacteria (Ellison et al., 1988), donde esta enzima rompe la unión entre el ácido N-acetilmurámico y el N-acetilglucosamina del peptidoglicano (Güçbilmez et al, 2007).

3.2.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los valores TEAC, expresados como los μg de sólido seco, presentes en 10 μl de extracto de proteína disuelta, que dan lugar al mismo porcentaje de reducción de absorbancia que 10 μl de disolución de Trolox a una concentración 300mg/l, fueron los siguientes: [LF: 158 (8)^a; LZ: 183 (4)^b; LF-LZ: 185 (7)^b].

Se observó como la LF presentó una actividad antioxidante significativamente superior a la LZ ($p < 0.05$), sin embargo, la mezcla de ambas proteínas en la misma proporción no tuvo un efecto sinérgico. Según trabajos anteriores, el efecto antioxidante de la LF está relacionado con su capacidad quelante de iones de Fe^{+2} , por lo que posee un fuerte potencial en su uso como antioxidante en alimentos (Stejins and Hooijdonk, 2000).

4. CONCLUSIONES

Las propiedades físicas y el comportamiento térmico de las películas a base de almidón de patata se vieron afectadas por la incorporación de lactoferrina, lisozima y la mezcla de ambas. La microestructura de las películas reflejó una compatibilidad parcial entre el almidón y las cadenas de las proteínas, lo que llevó a una cierta separación de fases. La presencia de proteínas dio lugar a un descenso de la rigidez, de la resistencia a la fractura y de la extensibilidad de los films, a una disminución de la permeabilidad al vapor de agua, a cambios en el color y a una reducción del brillo y la transparencia.

La incorporación de proteínas produjo un aumento de la temperatura de transición vítrea (asociada a la interacción de parte de las proteínas con las cadenas de almidón) y a un descenso de la temperatura de degradación.

No se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento de *L. innocua* entre el control y las muestras con proteína. Aunque ninguna de las dos proteínas mostró actividad antibacteriana contra *E. coli*, la combinación de las dos tuvo a una acción sinérgica, inhibiendo el crecimiento. Se comprobó la actividad antioxidante de las proteínas, por lo que éstas podrían utilizarse como antioxidantes naturales en la formulación de películas comestibles.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abril García-Montoya, I., Siqueiros Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2012) Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820 226–236.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 42, 1240-1253.
- Branen, J. K., & Davidson, P. M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 63–74.
- Cano, A.; Jiménez, A.; Cháfer, M.; González, C.; Chiralt, A. (2014) Characterization of starch films with different amylose:amylopectin ratio. Effect of rice bran addition. *Carbohydrate Polymers*, 111, 543-555.
- Chen, J., Liu, Ch., Chen, Y., Chen Y., Chang, P.R. (2008). Structural characterization and properties of starch/konjac glucomannan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 74, 946-952.
- Da Matta, M.D., Silveira, S.B., de Oliveira, L.M., Sandoval, S. (2011). Mechanical properties of pea starch films associated with xanthan gum and glycerol. *Starch*, 63, 274-282.
- Dole, P.; Joly, C.; Espuche, E.; Alric, I.; Gontard, N. (2004). Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 58, 335–343.
- Drago, M.E. (2006) Actividades antibacterianas de la lactoferrina. *ENF INF MICROBIOL*, 26 (2): 58-63.
- Ellison. R.T., Giehl. T.J., Laforcet M. (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and immunity*, 2774-2781.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292–303.
- Farahnaky. A., Farhat. I.A., Mitchell. J.R., Hill. S.E. (2009). The effect of sodium chloride on the glass transition of potato and cassava starches at low moisture contents. *Food Hydrocolloids*, 6, 1483-1487.
- Farnaud, S., Evans, R.W. (2003). Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395-405.
- Gennadios, A., Weller, C.L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44, 63-69.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International*, 33, 83-90.
- Güçbilmez, Ç.M., Yemenicioğlu, A., Arslanoğlu, A. (2007) Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein Wlms incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International* 40 80–91.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible protective films. En: Mathlouthi, M. (ed.). *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice*. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA, pp. 371-394.
- Han, J.H., Seo, G.H., Park, I.M., Kim, G.N., Lee, D.S. (2006). Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *Journal of Food Science*, 71 (6), 290-296.
- He. Y., Kong. W., Wang. W, Liu. T., Gong. Q., Gao. J., (2012). Modified natural halloysite/potato starch composite films. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2706-2711.
- Hutchings, J.B., 1999. Food colour and appearance. *Aspen Publishers, Maryland*.
- Jenssen, H., Hancock, R.E.W. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91 19-29.
- Jiménez, A.; Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2012a). Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films *Food Hydrocolloids*, 29(2), 265-279.
- 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(1), 302-310.

- Kristo, E., Koutsoumanis, K., Biliaderis, C. (2008). Thermal, mechanical and water vapour barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373–386.
- L. Atarés, J. Bonilla, A. Chiralt. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100, 678-687.
- Liu, Z. (2005). Edible films and coatings from starch. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 318–332). London: *Elsevier Academic Press*.
- Ma, X., Chang, P.R., Yu, J. (2008). Properties of biodegradable thermoplastic pea starch/carboxymethyl cellulose and pea starch/microcrystalline cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 72, 369-375.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Mehyar, G.F. and Han, J.H. (2004). Physical and mechanical properties of high-amylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *Journal of Food Science*, 69 (9), 449-454).
- Padgett, T., Han, I. Y., & Dawson, P. L. (1998). Incorporation of foodgrade antimicrobial compounds into biodegradable packaging Wlms. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1330–1335.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A., Luu, D. (2009). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- Sánchez-García, M.D., Giménez, E., & Lagaron, J.M. (2008). Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers* 71, 235-244.
- Souza, A.C., Benze, R., Ferrao, E.S., Ditchfield, C., Coelho, A.C.V., Tadini, C.C. (2011). Cassava starch biodegradable films: influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *Food Science and Technology*, 10-18.
- Steijns, J.M., Hooijdonk, A.C.M. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84, 11-17.
- Talja, R. A., Helén, H., Roos, Y. H., & Jouppila, K. (2007). Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 288e295.