

UNIVERSIDAD POLITECNICA  
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y  
BIOLÓGICAS DE PELÍCULAS BIOACTIVAS A BASE DE  
QUITOSANO Y SU EFECTO SOBRE LA EXTENSIÓN DE LA  
VIDA ÚTIL DE VEGETALES MÍNIMAMENTE PROCESADOS**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
**GABRIELA ANDREA GALLO**

Directora:  
**MARIANA ANGÉLICA MONTENEGRO**  
Tutora:  
**MARÍA TERESA CHÁFER NÁCHER**

Villa María, Argentina, octubre 2015

## Agradecimientos

---

*A toda mi familia por el apoyo incondicional que me han brindado durante todo el desarrollo de esta tesis; gracias a ellos tengo la fortaleza necesaria para seguir adelante; ellos han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo.*

*A mi directora, la Dra. Mariana A. Montenegro, por su tiempo y dedicación, y por brindarme sus conocimientos en todo momento; por su cariño y su apoyo.*

*A la Dra. Maite Cháfer Náchter por colaborar como Tutora de tesis.*

*A mis compañeras del Laboratorio de Alimentos por compartir conmigo el día a día; gracias por la cooperación desinteresada, y por brindarme su ayuda y amistad desde el primer momento.*

*Mi más sincero agradecimiento a las autoridades de la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos, y al Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Villa María a quienes debo el realizar este doctorado en estas Altas Casas de Estudios.*

*A todas aquellas personas que de alguna u otra manera me brindaron su tiempo para que pueda avanzar y concluir mi doctorado.*

## Resumen

---

A pesar de que el uso de los materiales de envasado convencionales, como plásticos y sus derivados, son efectivos para la preservación de los alimentos, generan serios problemas en el medio ambiente y en la salud del consumidor. El creciente interés por el desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables para la conservación de los alimentos se debe, principalmente, a las exigencias cada vez mayores de los consumidores respecto de reducir el impacto ambiental ocasionado por el uso de envases no biodegradables. Este hecho se suma a la tendencia actual de consumir productos seguros, de buena calidad y listos para el consumo, siendo las frutas y verduras mínimamente procesadas (MP) las que han sufrido un rápido incremento debido a que proporcionan beneficios para la salud. Sin embargo, los productos MP presentan un rápido deterioro de la calidad y reducción de la vida útil. En este contexto, los biopolímeros constituyen una fuente alternativa para el desarrollo de envases debido a su biodegradabilidad. El quitosano (Ch) es un biopolímero muy prometedor para uso como envase. Es biodegradable, biocompatible, presenta muy buena capacidad para formar películas semipermeables, presenta capacidad antimicrobiana y antioxidante. Adicionalmente, los envases activos están cobrando cada vez más interés debido a su potencial para proporcionar beneficios en la calidad y seguridad en los alimentos. La quercetina (Q) es un reconocido antioxidante natural que puede ser incorporado en el material de envasado.

## Resumen

---

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de recubrimientos biodegradables utilizando como base el Ch modificado con Q, y el estudio de sus propiedades físico-químicas, mecánicas, de barrera y microbiológicas para su empleo en la preservación de vegetales mínimamente procesados durante su almacenamiento.

En una primera etapa se realizó la caracterización del Ch nativo determinando el grado de desacetilación (DGA) y el peso molecular (PM). La derivatización de Ch con Q se realizó a través de la reacción catalizada por la enzima cloroperoxidasa (CPO) la cual actúa sobre el flavonoide transformándolo en la correspondiente quinona altamente reactiva frente a Ch. Se realizó la caracterización química del derivatizado determinando el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante por desactivación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$ . Luego se prepararon las películas a base de Ch y Ch-Q según el método propuesto por Bourbon y col. 2011, con algunas modificaciones, y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas tales como espesor, densidad, transparencia, opacidad, contenido de humedad y solubilidad en agua, capacidad antioxidante por desactivación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$ , propiedades mecánicas como tensión (TS) y deformación en la carga máxima (E), y propiedades barrera frente a oxígeno ( $O_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y vapor de agua. Además, se estudió la capacidad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Finalmente, se evaluó la estabilidad de zanahorias (*Daucus carota* L) mínimamente procesadas recubiertas, estudiándose la capacidad antimicrobiana durante el almacenamiento en

## Resumen

---

refrigeración frente a microorganismos mesófilos, psicrófilos, coliformes totales, *E. coli*, *S. aureus*, y hongos y levaduras. Además, se determinó la capacidad antioxidante, evaluando el contenido de ácido ascórbico (AA) y  $\beta$ -caroteno de las muestras recubiertas con solución formadora de film a base de Ch y Ch-Q.

Los resultados obtenidos indican que la incorporación de la Q en la matriz polimérica, a través de la formación del aducto Ch-Q, modificó las propiedades de los films. El empleo de Ch derivatizado con Q, permitió obtener recubrimientos con mejores propiedades, principalmente en lo que respecta a espesor, densidad, propiedades ópticas, antimicrobianas, antioxidantes y de barrera frente a O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El mayor grado de reticulación del polímero debido a las interacciones entre la matriz de Ch y la Q, provocó un aumento en TS. Además, la mayor afinidad con el agua que presentaron los films logró incrementar el valor de E; sin embargo, este efecto se vio reducido por la mayor resistencia y rigidez de la estructura polimérica del film.

Los resultados microbiológicos *in vitro* y sobre las zanahorias recubiertas, indican que los films biodegradables a base Ch-Q, con una concentración del 1% (p/v), son una alternativa viable en el control de los microorganismos evaluados. La incorporación de la Q resultó en un efecto sinérgico con el Ch, logrando controlar la microbiota presente en el vegetal MP.

La presencia de Q influyó de manera positiva sobre el efecto antioxidante presentado por la molécula de Ch funcionalizada y por el film; siendo las

## Resumen

---

características estructurales de la Q, determinantes para aumentar la actividad antioxidante. Respecto de la evaluación sobre la estabilidad de las muestras de zanahorias MP, se obtuvo un efecto protector frente a la pérdida de  $\beta$ -caroteno; sin embargo, el contenido de AA sufrió una disminución de al menos 70%, no pudiéndose determinar si algún tratamiento tuvo efecto protector sobre esta vitamina.

Conforme a estos resultados, este tipo de recubrimiento resulta adecuado para la aplicación sobre zanahorias MP procurando la mejora de la calidad y el aumento de la vida útil de las mismas, presentando un alto potencial para ser utilizados como material de embalaje alternativo o complementario a los materiales sintéticos. No obstante, es posible continuar trabajando a fin de optimizar algunas propiedades, como la permeabilidad al vapor de agua.

## Resum

---

Tot i que l'ús dels materials d'envasat convencionals, com plàstics i els seus derivats, són efectius per a la preservació dels aliments, generen seriosos problemes en el medi ambient i en la salut del consumidor. El creixent interès pel desenvolupament de pel·lícules i recobriments biodegradables per a la conservació dels aliments es deu, principalment, a les exigències cada vegada majors dels consumidors respecte de reduir l'impacte ambiental ocasionat per l'ús d'envasos no biodegradables. Aquest fet se suma a la tendència actual de consumir productes segurs, de bona qualitat i llestos per al consum, sent les fruites i verdures mínimament processades (MP) les que han patit un ràpid increment pel fet que proporcionen beneficis per a la salut. No obstant això, els productes MP presenten un ràpid deteriorament de la qualitat i reducció de la vida útil. En aquest context, els biopolímers constitueixen una font alternativa per al desenvolupament d'envasos causa de la seva biodegradabilitat. El quitosan (Ch) és un biopolímer molt prometedor per a ús com a envàs. És biodegradable, biocompatible, presenta molt bona capacitat per formar pel·lícules semipermeables, presenta capacitat antimicrobiana i antioxidant. Addicionalment, els envasos actius estan cobrant cada vegada més interès causa del seu potencial per proporcionar beneficis en la qualitat i seguretat en els aliments. La quercetina (Q) és un reconegut antioxidant natural que pot ser incorporat en el material d'envasament.

L'objectiu del present treball va ser l'obtenció de recobriments biodegradables utilitzant com a base el Ch modificat amb Q, i l'estudi de les

## Resum

---

seves propietats fisicoquímiques, mecàniques, de barrera i microbiològiques per a la seva ocupació en la preservació de vegetals mínimament processats durant l'emmagatzematge.

En una primera etapa es realitza la caracterització del Ch natiu determinant el grau d'acetilació (DGA) i el pes molecular (PM). La derivatització de Ch amb Q es va realitzar a través de la reacció catalitzada per l'enzim cloroperoxidasa (CPO) la qual actua sobre el flavonoide transformant-ho en la corresponent quinona altament reactiva enfront de Ch. Es va realitzar la caracterització química de l'derivatitzat determinant el contingut de polifenols i la capacitat antioxidant per desactivació d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i •OH. Després es van preparar les pel·lícules a força de Ch i Ch-Q segons el mètode proposat per Bourbon i col. 2011, amb algunes modificacions, i es van avaluar les propietats fisicoquímiques com ara gruix, densitat, transparència, opacitat, contingut d'humitat i solubilitat en aigua, capacitat antioxidant per desactivació d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i •OH, propietats mecàniques com tensió (TS) i deformació en la càrrega màxima (I), i propietats barrera davant oxigen (O<sub>2</sub>), diòxid de carboni (CO<sub>2</sub>) i vapor d'aigua. A més, es va estudiar la capacitat antimicrobiana enfront de *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Finalment, es va avaluar l'estabilitat de pastanagues (*Daucus carota* L) mínimament processades recobertes, estudiant-la capacitat antimicrobiana durant l'emmagatzematge en refrigeració enfront de microorganismes mesòfils, psicròfils, coliformes totals, *E. coli*, *S. aureus*, i fongs i llevats. A més, es va determinar la capacitat antioxidant, avaluant el contingut d'àcid



## Resum

---

ascòrbic (AA) i  $\beta$ -carotè de les mostres recobertes amb solució formadora de film a força de Ch i Ch-Q.

Els resultats obtinguts indiquen que la incorporació de Q en la matriu polimèrica, a través de la formació de l'adducte Ch-Q, va modificar les propietats dels films. L'ocupació de Ch derivatitzado amb Q, va permetre obtenir recobriments amb millors propietats, principalment pel que fa a gruix, densitat, propietats òptiques, antimicrobianes, antioxidants i de barrera davant O<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>. El major grau de reticulació del polímer causa de les interaccions entre la matriu de Ch i la Q, va provocar un augment en TS. A més, la major afinitat amb l'aigua que van presentar els films va aconseguir incrementar el valor d'E; però, aquest efecte es va veure reduït per la major resistència i rigidesa de l'estructura polimèrica del film.

Els resultats microbiològics in vitro i sobre les pastanagues recobertes, indiquen que els films biodegradables a força Ch-Q, amb una concentració de l'1% (p / v), són una alternativa viable en el control dels microorganismes avaluats. La incorporació de la Q va resultar en un efecte sinèrgic amb el Ch, aconseguint controlar la microbiota present en el vegetal MP.

La presència de Q influeix de manera positiva sobre l'efecte antioxidant presentat per la molècula de Ch funcionalitzada i pel film; sent les característiques estructurals de la Q, determinants per augmentar l'activitat antioxidant. Respecte de l'avaluació sobre l'estabilitat de les mostres de pastanagues MP, es va obtenir un efecte protector enfront de la pèrdua de  $\beta$ -carotè; però, el contingut d'AA va patir una disminució d'almenys 70%, no

## Resum

---

podent determinar si algun tractament va tenir efecte protector sobre aquesta vitamina.

D'acord amb aquests resultats, aquest tipus de recobriment resulta adequat per l'aplicació sobre pastanagues MP procurant la millora de la qualitat i l'augment de la vida útil de les mateixes, presentant un alt potencial per ser utilitzats com a material d'embalatge alternatiu o complementari als materials sintètics. Tanmateix, és possible continuar treballant per tal d'optimitzar algunes propietats, com ser la permeabilitat al vapor d'aigua.

## Abstract

---

Although the use of conventional packaging materials such as plastics and its derivatives are effective for food preservation, they generate serious problems for the environment and consumer health. The growing demand of consumers to reduce the environmental impact caused by the use of non-biodegradable materials had a great influence to the interest in the development of biodegradable films and coatings. This fact is added to the current trend of consuming safe, good quality and ready-to-eat products, being minimally processed (MP) fruits and vegetables that have undergone a fast increase because they provide health benefits. However, the MP products show a quick quality deterioration and shelf life reduction. In this context, the biopolymers are an alternative source for the development of materials due to their biodegradability. The chitosan (Ch) is a promising biopolymer for use as packaging. It is biodegradable, biocompatible, has very good ability to form semipermeable films, has antimicrobial and antioxidant capacity. Additionally, active packaging has more interesting due to their potential to provide benefits in quality and food safety. Quercetin (Q) is a known natural antioxidant that can be incorporated into the packaging material.

The aim of this thesis was to obtain biodegradable films based in modified Ch with Q, and to study their physico-chemical, mechanical, microbiological, and barrier properties for use in the preservation of MP vegetables during storage.

Native Ch characterization was performed at an initial stage. It was made by determining the degree of deacetylation (DDA) and molecular weight

## Abstract

---

(MW). Ch derivatization was made by the chloroperoxidase enzyme (CPO) which reacts with the flavonoid modifying it into the related quinone, highly reactive to Ch. Chemical characterization of the derivatized molecule was made by determining the content of polyphenols and antioxidant capacity by scavenging  $O_2^{\cdot-}$  and  $\cdot OH$ . Ch and Ch-Q based films were prepared according to the method proposed by Bourbon et al. 2011, with some modifications. Physicochemical properties such as thickness, density, transparency, opacity, moisture content and solubility in water were evaluated. Also, they were studied antioxidant capacity by scavenging  $O_2^{\cdot-}$  and  $\cdot OH$ , mechanical properties such as stress (TS) and strain at maximum load (E), and oxygen ( $O_2$ ), carbon dioxide ( $CO_2$ ) and water vapor barrier properties. Furthermore, the antimicrobial ability against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* was investigated. Finally, the stability of coated MP carrots (*Daucus carota* L) was evaluated by studying the antimicrobial activity during refrigerated storage against mesophilic and psychophilic microorganisms, total coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, and fungi and yeasts. In addition, the antioxidant capacity was evaluated by determining the ascorbic acid (AA) and  $\beta$ -carotene content of samples coated with Ch and Ch-Q based film forming solution.

Results indicate that the incorporation of Q in the polymeric matrix, through the Ch-Q adduct formation, modified the films properties. The use of Ch derivatized by Q, yielded coatings with better properties, especially with regard to thickness, density, optical, antimicrobial, and antioxidant

## Abstract

---

properties, and capability barrier to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. The TS was increased due to the greatest degree of polymer crosslinking because Ch matrix-Q interactions. In addition, greater affinity with water than films had managed, increase the value of E; nevertheless, this effect was reduced because of the higher strength and stiffness of the polymeric film structure.

Microbiological results of in vitro and coated carrots, indicate that biodegradable Ch-Q based films, with a concentration of 1% (w / v), are a feasible alternative in control of the microorganisms evaluated. The incorporation of Q resulted in a synergistic effect with Ch, controlling the microbiota present in the MP vegetable.

The presence of Q had a positive influence on the antioxidant effect showed by functionalized molecule of Ch and film. Structural characteristics of Q had been decisive to increase the antioxidant activity. Regarding to the evaluation of the stability of MP carrots samples, a protective effect against loss of  $\beta$ -carotene was obtained; however, the content of AA was decreased at least 70%, could not be determined if any treatment had protective effect on this vitamin.

According to these results, this type of coating is suitable for application to MP carrots improving quality and increasing their shelf life. It shows a high potential to be used as alternative packaging material or supplementary to the synthetic materials. However, it is possible to continue working to optimize certain properties, such as water vapor permeability.

# Índice de contenidos

---

I.	INTRODUCCIÓN.....	2
I.1.	Envasado de productos alimenticios.....	2
I.1.1.	Principales polímeros sintéticos utilizados en el envasado de alimentos. 8	
I.1.1.1.	Propiedades y tipos de plásticos.....	11
I.1.1.1.1.	Producción y consumo.....	18
I.1.1.1.2.	Efecto sobre el medio ambiente y la salud.....	21
I.2.	Vegetales mínimamente procesados.....	29
I.3.	Recubrimientos biodegradables.....	39
I.3.1.	Envases activos.....	47
I.4.	Quitina y quitosano.....	53
I.4.1.	Extracción de quitina.....	57
I.4.2.	Obtención de quitosano.....	59
I.4.2.1.	Caracterización.....	63
I.4.2.2.	Propiedades biológicas.....	66
I.4.2.3.	Propiedades antimicrobianas.....	67
I.4.2.4.	Capacidad formadora de film.....	69
I.4.2.5.	Propiedades antioxidantes.....	70
I.4.2.5.1.	Quitosano como envase bioactivo antioxidante.....	71
I.4.2.6.	Otras propiedades biológicas de interés.....	74
I.4.3.	Funcionalización del quitosano.....	77
I.5.	Quercetina.....	87
II.	OBJETIVOS.....	99
II.1.	Objetivo general.....	99

## Índice de contenidos

---

II.2. Objetivos específicos.....	99
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
III.1. Reactivos .....	102
III.2. Microorganismos y medios de cultivo.....	103
III.2.1. Medios de cultivo .....	104
III.3. Metodología.....	106
III.3.1. Caracterización del Ch nativo .....	106
III.3.1.1. Grado de acetilación (% GDA) .....	106
III.3.1.1.1. Por titulación potenciométrica .....	106
III.3.1.1.2. Por espectroscopía IR .....	107
III.3.1.2. Determinación del peso molecular (PM).....	108
III.3.1.2.1. Por viscosimetría .....	108
III.3.1.2.2. Por cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	111
III.3.2. Derivatización del quitosano .....	111
III.3.3 Caracterización química del Ch derivatizado.....	114
III.3.3.1. Cuantificación de polifenoles y eficiencia de reacción de derivatización .....	114
III.3.3.2. Propiedad antioxidante .....	115
III.3.3.2.1. Desactivación de $O_2^{\bullet-}$ .....	116
III.3.3.2.2. Desactivación de $\cdot OH$ : Método de la desoxirribosa .....	117
III.3.4. Obtención del film biodegradable.....	118
III.3.4.1. Film a base de Ch nativo y Ch derivatizado .....	118
III.3.5. Caracterización del film biodegradable .....	119

## Índice de contenidos

---

III.3.5.1. Propiedades físico-químicas .....	119
III.3.5.1.1. Medida del espesor y densidad del film .....	119
III.3.5.1.2. Propiedades ópticas .....	120
III.3.5.1.3. Contenido de humedad y solubilidad en agua .....	121
III.3.5.2. Propiedades mecánicas .....	122
III.3.5.3. Propiedades barrera.....	123
III.3.5.3.1. Permeabilidad al vapor de agua .....	123
III.3.5.3.2. Permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono .....	124
III.3.5.4. Propiedades microbiológicas.....	125
III.3.5.4.1. Capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	125
III.3.5.5. Propiedades antioxidantes .....	126
III.3.5.5.1. Desactivación de radical $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$ .....	126
III.3.6. Estabilidad de vegetales recubiertos.....	127
III.3.6.1. Capacidad antimicrobiana .....	127
III.3.6.1.1. Procedimiento para el análisis microbiológico .....	128
III.3.6.1.2. Análisis estadístico de los resultados.....	134
III.3.6.2. Actividad antioxidante.....	135
III.3.6.2.1. Determinación del contenido de AA.....	136
III.3.6.2.2. Determinación del contenido de $\beta$ -caroteno .....	139
III.3.6.2.3. Análisis estadístico de los resultados.....	143
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	145
IV. 1.Caracterización del quitosano nativo .....	145
IV. 1.1. Determinación del grado de desacetilación (% DGA).....	145



## Índice de contenidos

---

IV. 1.2. Determinación del peso molecular (PM).....	148
IV.2. Derivatización del quitosano.....	151
IV.2.1. Seguimiento de reacción de oxidación de Q con CPO .....	151
IV.3 Caracterización química del Ch derivatizado .....	152
IV.3.1 Cuantificación de polifenoles y eficiencia de reacción de derivatización .....	152
IV.3.2 Propiedades antioxidantes de la molécula derivatizada .....	154
IV.3.2.1. Desactivación de $O_2^{\bullet-}$ .....	154
IV.3.2.2. Desactivación de $\bullet OH$ .....	156
IV.4. Caracterización del film biodegradable.....	161
IV.4.1. Propiedades físico-químicas y propiedades barrera .....	161
IV.4.1.1. Medida del espesor y densidad, y permeabilidad al $O_2$ , $CO_2$ y vapor de agua.....	161
IV.4.2. Propiedades ópticas .....	178
IV.4.3. Contenido de humedad y solubilidad en agua .....	180
IV.4.4. Propiedades mecánicas.....	182
IV.4.5. Propiedades microbiológicas .....	185
IV.4.5.1. Capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	185
IV.4.6. Propiedades antioxidantes.....	191
IV.5. Estabilidad de vegetales recubiertos .....	194
IV.5.1. Capacidad antimicrobiana.....	194
IV.5.1.1. Recuento de <i>S. aureus</i> .....	195
IV.5.1.2. Recuento de bacterias coliformes totales .....	195

## Índice de contenidos

---

IV.5.1.3. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales.....	197
IV.5.1.4. Recuento de hongos y levaduras .....	199
IV.5.1.5. Recuento de microorganismos psicrótrofos .....	204
IV.5.2. Actividad antioxidante .....	210
IV.5.2.1. Determinación del contenido de ácido ascórbico .....	210
IV.5.2.2. Determinación del contenido de $\beta$ -caroteno .....	216
V. CONCLUSIONES.....	224
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	230

## Índice de figuras

---

<b>FIGURA 1.</b> PRODUCCIÓN DE PLÁSTICOS A NIVEL MUNDIAL 1950-2008 (ADAPTADO DE <i>PLASTIC WASTE: ECOLOGICAL AND HUMAN HEALTH IMPACTS, 2011</i> ).....	20
<b>FIGURA 2.</b> PROPORCIÓN DE RESIDUOS PLÁSTICOS POST-CONSUMO CLASIFICADOS SEGÚN SU FUNCIÓN (ADAPTADO DE <i>PLASTIC WASTE: ECOLOGICAL AND HUMAN HEALTH IMPACTS, 2011</i> ).....	24
<b>FIGURA 3.</b> DIAGRAMA DE FRUJO DE PROCESAMIENTO MÍNIMO DE VEGETALES ( <i>PARZANESE, 2011</i> ).....	37
<b>FIGURA 4.</b> BIOPOLIMÉRICOS DE ORIGEN NATURAL USADOS, SOLOS O EN COMBINACIÓN, PARA FORMULAR RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES (ADAPTADO DE <i>THARANATHAN, 2003</i> )	42
<b>FIGURA 5.</b> PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES APLICADOS A FRUTAS Y VERDURAS FRESCAS (ADAPTADO DE <i>LIN Y COL., 2007</i> ).....	44
<b>FIGURA 6.</b> DIAGRAMA PRESENTANDO LAS 3 ESTRUCTURA POLIMÓRFICAS DE LA QUITINA: (A) A- QUITINA (B) B-QUITINA (C) A- QUITINA (ADAPTADO DE <i>AHMED Y IKRAM, 2015</i> ).....	55
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DE (A) CELULOSA Y (B) QUITINA (ADAPTADO DE <i>GUPTA Y RAVI KUMAR, 2000</i> ).....	56
<b>FIGURA 8.</b> OBTENCIÓN DE QUITINA POR EL MÉTODO QUÍMICO Y BIOLÓGICO (ADAPTADO DE <i>ARBIA Y COL., 2013</i> ).....	58
<b>FIGURA 9.</b> OBTENCIÓN DE CH A PARTIR DE QUITINA (MÉTODO QUÍMICO Y ENZIMÁTICO) (ADAPTADO DE <i>AHMED Y COL., 2015</i> ).....	60
<b>FIGURA 10.</b> GRUPOS FUNCIONALES REACTIVOS DEL CH (ADAPTADO DE <i>MOURYA Y INAMDAR, 2008</i> ).....	62
<b>FIGURA 11.</b> MECANISMO DE REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR POD EN PRESENCIA DE CH (ADAPTADO DE <i>ALJAWISH Y COL., 2015</i> ).....	81
<b>FIGURA 12.</b> A) ESQUEMA MOLECULAR DE LA PROTOPORFIRINA DE HIERRO IX, GRUPO HEMO DE LAS POD. B) DIAGRAMA DE CINTA DE CPO CON EL GRUPO HEMO EN COLOR ROJO. ( <i>TERÁN Y COL., 2013</i> ).....	82
<b>FIGURA 13.</b> CICLO CATALÍTICO DE LA ENZIMA POD. (ADAPTADO DE <i>TERÁN Y COL., 2013</i> ) ...	84
<b>FIGURA 14.</b> OXIDACIÓN ENZIMÁTICA CATALIZADA POR POD SOBRE COMPUESTOS FENÓLICOS (ADAPTADO DE <i>HOLLMANN Y COL., 2012</i> ).....	85
<b>FIGURA 15.</b> ESTRUCTURA BÁSICA DE UN FLAVONOIDE ( <i>PIETTA, 2000</i> ).....	87
<b>FIGURA 16.</b> ESTRUCTURA DE VARIAS CLASES DE FLAVONOIDES. (A) FLAVONAS; (B) FLAVONOLES; (C) ISOFLAVONAS; (D) FLAVANONAS (ADAPTADO DE <i>PIETTA, 2000</i> ).....	89
<b>FIGURA 17.</b> ESTRUCTURA DE LA Q Y ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VIS. ....	94
<b>FIGURA 18.</b> TRIÁNGULO DE HAUG ( <i>GARTNER Y LÓPEZ, 2010</i> ).....	110

## Índice de figuras

---

<b>FIGURA 19.</b> MECANISMO DE REACCIÓN DE CH CON Q: OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE Q, FORMACIÓN DE QUINONA Y OBTENCIÓN DEL ADUCTO Q-CH (TORRES Y COL., 2012)....	112
<b>FIGURA 20.</b> ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ZANAHORIA PARA REALIZAR EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO (ADAPTADO DE CAMACHO, 2009).....	129
<b>FIGURA 21.</b> DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE LAS ETAPAS NECESARIAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE $\beta$ -CAROTENO DE MUESTRAS DE ZANAHORIAS. ..	142
<b>FIGURA 22.</b> CURVA DE TITULACIÓN POTENCIOMÉTRICA DE UNA SOLUCIÓN DE CH NATIVO DE 1G/L.....	146
<b>FIGURA 23.</b> SEGUNDA DERIVADA DE LA FUNCIÓN QUE REPRESENTA LA CURVA DE pH VS. VOLUMEN DE NAOH GASTADOS PARA CH NATIVO .....	146
<b>FIGURA 24.</b> ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN IR DE LA MOLÉCULA DE CH NATIVO. ....	147
<b>FIGURA 25.</b> VISCOSIDAD REDUCIDA ( $H_{REDUCIDA}$ ) FRENTE A LA CONCENTRACIÓN DE CH.....	149
<b>FIGURA 26.</b> ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE Q QUE MUESTRA EL SEGUIMIENTO DEL AVANCE DE REACCIÓN DE SU OXIDACIÓN BIOLÓGICA CON ENZIMA CPO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO: Q SIN MODIFICAR (—); Q MODIFICADA LUEGO DE 4 MIN DE REACCIÓN (—).....	151
<b>FIGURA 27.</b> CURVA DE CALIBRACIÓN DE QUERCETINA. VALORES DE ABSORBANCIA A $\lambda=750$ NM A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ESTÁNDAR. ....	153
<b>FIGURA 28.</b> % DESACTIVACIÓN COMPARATIVA (%) ENTRE MOLÉCULA DE CH Y CH-Q, FRENTE A $O_2^{\cdot-}$ EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EVALUADAS (0,11, 0,22 Y 0,44 MG/ML). ....	155
<b>FIGURA 29.</b> % DESACTIVACIÓN COMPARATIVA (%) ENTRE MOLÉCULA DE CH Y CH-Q, FRENTE A $\cdot OH$ EN FUNCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EVALUADAS (0,11, 0,22 Y 0,44 MG/ML) ....	157
<b>FIGURA 30.</b> GRUPOS IMPORTANTES PARA UNA EFECTIVA ACTIVIDAD EN LOS FLAVONOIDES CONTRA LAS EROS. A) GRUPO CATECOL, B) GRUPO 4-OXO EN ANILLO C Y DOBLE ENLACE C2-C3, C) 3-, 5-OH EN ANILLO C Y A (JANEIRO Y COL., 2005).....	160
<b>FIGURA 31.</b> MECANISMO GENERAL DE PERMEACIÓN DE UN GAS O VAPOR DE AGUA A TRAVÉS DE UN FILM PLÁSTICO (SIRACUSA, 2012).....	168
<b>FIGURA 32.</b> PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA Y AL $O_2$ PARA DIFERENTES POLÍMEROS SINTÉTICOS (ESPESOR DEL MATERIAL: 100 $\mu m$ , TEMPERATURA: 23°C) Y EL FILM A BASE DE CH Y CH-Q. LDPE: POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD, EVA: ETILENVINILACETATO, PP: POLIPROPILENO, BOPP: POLIPROPILENO BIORIENTADO, PVC: CLORURO DE POLIVINILO, PET: TEREFALATO DE POLIETILENO, PA6: POLIAMIDA, PEN: NAFTALATO	

## Índice de figuras

---

DE POLIETILENO, PAN: POLIACRILONITRILO, PVDC: CLORURO DE POLIVINILIDENO, EVOH: ETILEN-VINIL ALCOHOL, LCP: POLÍMERO DE CRISTAL LÍQUIDO. (ADAPTADO DE <i>LÁMINAS PARA EL ENVASADO. GUÍA TÉCNICA. PENTAFOOD</i> ) .....	176
<b>FIGURA 33.</b> VIABILIDAD DE <i>E. COLI</i> EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO CON EL FILM A BASE DE CH (A); Y CON EL FILM A BASE DE CH-Q (B): BUFFER PH=6,8 (◆); BUFFER PH=6,8 + FILM (●); BUFFER PH=5,0 (▲) .....	186
<b>FIGURA 34.</b> VIABILIDAD DE <i>S. AUREUS</i> EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO CON EL FILM A BASE DE CH (A); Y CON EL FILM A BASE DE CH-Q (B): BUFFER PH=6,8 (◆); BUFFER PH=6,8 + FILM (●); BUFFER PH=5,0 (▲) .....	187
<b>FIGURA 35.</b> EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS FRENTE A HONGOS Y LEVADURAS DE ZANAHORIAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS ALMACENADAS A 4 °C DURANTE 14 DÍAS .	201
<b>FIGURA 36.</b> EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS FRENTE A BACTERIAS PSICRÓTROFAS DE ZANAHORIAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS ALMACENADAS A 4 °C DURANTE 14 DÍAS .	206
<b>FIGURA 37.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL AA ( <i>FRENICH Y COL., 2005</i> ) .....	211
<b>FIGURA 38.</b> CROMATOGRAMA DE MUESTRAS DE ZANAHORIAS A TIEMPO 0 (LÍNEA VERDE Y AZUL), Y LUEGO DE 3 DÍAS DE REFRIGERACIÓN, POR DUPLICADO Y CUANTIFICADO POR MÉTODO DE ESTÁNDAR EXTERNO CON ADICIONES DE 5 MG/100G (LÍNEA NEGRA) Y 10 MG/100G (LÍNEA ROSA).....	212
<b>FIGURA 39.</b> ESTRUCTURA QUÍMICA DEL B-CAROTENO ( <i>FRENICH Y COL., 2005</i> ) .....	216
<b>FIGURA 40.</b> CROMATOGRAMA DE MUESTRA DE ZANAHORIA A TIEMPO 0D. ....	216
<b>FIGURA 41.</b> PORCENTAJE DE RETENCIÓN DE B-CAROTENO DE ZANAHORIAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS ALMACENADAS BAJO REFRIGERACIÓN DURANTE 10 DÍAS, SR (LÍNEA AZUL), CH (LÍNEA AMARILLA), CH-Q (LÍNEA VERDE).....	218

## Índice de tablas

---

<b>TABLA 1.</b> VALORES COMPARATIVOS DE % GDA SEGÚN METODOLOGÍA APLICADA. ....	148
<b>TABLA 2.</b> PESO MOLECULAR DE CH NATIVO SEGÚN MÉTODO VISCOSIMÉTRICO Y SEC.....	150
<b>TABLA 3.</b> PORCENTAJES DE DESACTIVACIÓN (%D) DE RADICAL $O_2^{\bullet-}$ POR CH NATIVO Y CH DERIVATIZADO (CH-Q).....	155
<b>TABLA 4.</b> PORCENTAJES DE DESACTIVACIÓN (%D) DE RADICAL $\bullet OH$ POR CH NATIVO Y CH DERIVATIZADO (CH-Q).....	157
<b>TABLA 5.</b> EFECTO DE LA DERIVATIZACIÓN DE CH NATIVO CON Q SOBRE EL ESPESOR, DENSIDAD Y PROPIEDADES BARRERA DEL FILM.....	162
<b>TABLA 6.</b> EFECTO DE LA DERIVATIZACIÓN DE CH NATIVO CON Q SOBRE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS DEL FILM .....	178
<b>TABLA 7.</b> EFECTO DE LA DERIVATIZACIÓN DE CH NATIVO CON Q SOBRE EL CONTENIDO DE HUMEDAD Y SOLUBILIDAD EN AGUA DEL FILM.....	181
<b>TABLA 8.</b> EFECTO DE LA DERIVATIZACIÓN DE CH NATIVO CON Q SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS: TS, Y %E .....	183
<b>TABLA 9.</b> PORCENTAJE DE REDUCCIÓN (%R) DE <i>E. COLI</i> Y <i>S. AUREUS</i> EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO CON EL FILM A BASE DE CH Y CH-Q.....	188
<b>TABLA 10.</b> PORCENTAJE DE DESACTIVACIÓN (% D) FRENTE A RADICAL $O_2^{\bullet-}$ Y $\bullet OH$ DE LA FRACCIÓN SOLUBLE (0,38 MG/ML) DE LAS PELÍCULAS DE CH Y CH-Q.....	192
<b>TABLA 11.</b> TEST LSD PARA LOG UFC/G DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS POR TRATAMIENTO APLICADO A LAS MUESTRAS AL INICIO DEL ENSAYO. SE PRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE LOG UFC/G Y EL VALOR DE DESVIACIÓN ESTANDARD. LETRAS IGUALES NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS .....	198

## Índice de tablas

---

<b>TABLA 12.</b> TEST DE HIPÓTESIS PARA MICROORGANISMOS MESÓFILOS. HIPÓTESIS NULA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS = 0,0. HIPÓTESIS ALTERNATIVA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS $\neq$ 0,0.....	199
<b>TABLA 13.</b> RECUENTO DE HONGOS Y LEVADURAS (LOG UFC/G) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y %R OBTENIDOS ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EVALUADOS .....	200
<b>TABLA 14.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA HONGOS Y LEVADURAS A LOS TIEMPOS 0, 4, 8 Y 14 DÍAS DE ALMACENAMIENTO BAJO REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS (SR, CH, CH-Q).....	202
<b>TABLA 15.</b> TEST LSD PARA LOG UFC/G DE HONGOS Y LEVADURAS POR TRATAMIENTO APLICADO A LAS MUESTRAS A LOS 4 TIEMPOS EVALUADOS. SE PRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE LOG UFC/G Y EL VALOR DE DESVIACIÓN ESTANDARD. LETRAS IGUALES NO PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS .....	203
<b>TABLA 16.</b> TEST DE HIPÓTESIS PARA HONGOS Y LEVADURAS. HIPÓTESIS NULA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS = 0,0. HIPÓTESIS ALTERNATIVA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS $\neq$ 0,0.....	204
<b>TABLA 17.</b> RECUENTO DE MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS (LOG UFC/G) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y %R OBTENIDOS ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EVALUADOS.....	205
<b>TABLA 18.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PSICRÓTROFOS A LOS TIEMPOS 0, 4, 8 Y 14 DÍAS DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS CON DIFERENTES RECUBRIMIENTOS .....	207
<b>TABLA 19.</b> TEST LSD PARA LOG UFC/G DE MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS POR TRATAMIENTO APLICADO A LAS MUESTRAS A LOS 4 TIEMPOS EVALUADOS. SE PRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DE LOG UFC/G Y EL VALOR DE DESVIACIÓN ESTANDARD. LETRAS IGUALES NO REPRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS .....	208

## Índice de tablas

---

<b>TABLA 20.</b> TEST DE HIPÓTESIS PARA MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS. HIPÓTESIS NULA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS = 0,0. HIPÓTESIS ALTERNATIVA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS $\neq$ 0,0.....	209
<b>TABLA 21.</b> CONTENIDO DE $\beta$ -CAROTENO (MG/100G) DE LAS MUESTRAS DE ZANAHORIAS SR, CH Y CH-Q A LOS TIEMPOS 0, 3, 7 Y 10 DÍAS DE ALMACENAMIENTO BAJO REFRIGERACIÓN .....	219
<b>TABLA 22.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA $\beta$ -CAROTENO A LOS TIEMPOS 3, 7 Y 10 DÍAS DE ALMACENAMIENTO BAJO REFRIGERACIÓN DE LAS MUESTRAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS (SR, CH, CH-Q) .....	220
<b>TABLA 23.</b> TEST LSD PARA CONTENIDO DE $\beta$ -CAROTENO (MG/100G) POR TRATAMIENTO APLICADO A LAS MUESTRAS A LOS 3 TIEMPOS EVALUADOS. SE PRESENTAN LOS VALORES MEDIOS DEL CONTENIDO DE $\beta$ -CAROTENO Y EL VALOR DE DESVIACIÓN ESTANDARD. LETRAS IGUALES NO REPRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.....	220
<b>TABLA 24.</b> TEST DE HIPÓTESIS PARA $\beta$ -CAROTENO. HIPÓTESIS NULA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS = 0,0. HIPÓTESIS ALTERNATIVA: DIFERENCIA ENTRE MEDIAS $\neq$ 0,0 .....	221



# Introducción

---

## I. INTRODUCCIÓN

# Introducción

---

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Envasado de productos alimenticios

En los últimos años la industria alimentaria está afrontando cambios y necesita diferentes estrategias para poder solucionarlos. Uno de esos cambios es lo referente al envasado de productos alimenticios. El envase de los alimentos no sólo proporciona un medio para el transporte seguro de los mismos, sino que también actúa como barrera protectora frente a bacterias nocivas, contaminación y degradación (Siracusa, 2008). A pesar de que los materiales de envasado convencionales como plásticos y sus derivados son efectivos para el almacenamiento y preservación de los alimentos, la mayoría son materiales sintéticos derivados del petróleo que generan serios problemas en nuestra sociedad, tanto por la polución, como por el volumen de desechos y el poder deshacerse de ellos (Aider, 2010).

Las tecnologías actuales de envasado tienen por objeto preservar la frescura y la integridad de los alimentos al tiempo que proporcionan a las empresas una forma barata y eficiente para envasar sus productos (Chin, 2010). Aunque este método es efectivo, la creciente preocupación por el medio ambiente y las exigencias cada vez mayores de reducir el impacto en la contaminación ambiental ocasionada por el uso de envases no biodegradables y por el vertido a los lechos marinos de la mayoría de los desechos, ha aumentado el interés por el desarrollo de películas y recubrimientos biodegradables que mantengan la seguridad, funcionalidad y

## Introducción

---

resistencia mecánica al igual que los envases de materiales sintéticos que se utilizan actualmente (García, 2008). Los programas de reciclaje también están trabajando en conjunto con los nuevos cambios tecnológicos para hacer frente a la creciente preocupación sobre lograr un método más ecológico para la producción de envases alimentarios (Santos y col., 2005; Subramanian, 2000).

Según un nuevo Resumen Científico emitido por The Institute of Food Technologists (IFT) en el año 2007, las principales funciones de los envases alimentarios son proteger a los productos alimenticios de las influencias y daños externos, contener el alimento y proporcionar a los consumidores información nutricional referida a los ingredientes utilizados durante su fabricación (Coles, 2003). La trazabilidad, la conveniencia y la indicación sobre su manipulación, son funciones secundarias de importancia creciente. El objetivo del envase es contener alimentos de una manera costo-efectiva que satisfaga los requerimientos de la industria y los deseos del consumidor, que mantenga la seguridad alimentaria y minimice el impacto medioambiental (Marsh y col., 2007a).

Cuando se menciona como función del envase alimentario, la protección y la preservación, significa frenar o inhibir los cambios químicos y biológicos, y proteger al alimento contra el daño físico. El envasado juega un papel primordial en la protección de los alimentos desde el fabricante hasta que llega al consumidor. El envase está diseñado para garantizar que el producto llegue al consumidor en buen estado, es decir, que retarde el

## Introducción

---

deterioro del producto, conserve los efectos beneficiosos de la elaboración, extienda la vida útil y mantenga o aumente la calidad y seguridad de los alimentos. El embalaje ofrece protección frente a tres tipos de influencias externas: químicas, biológicas, y físicas.

- Protección química: se minimizan los cambios de composición desencadenados por factores ambientales tales como la exposición a los gases, humedad o luz. Diferentes materiales de envasado pueden proporcionar una barrera química. El vidrio y el metal proporcionan una barrera casi absoluta a los agentes ambientales químicos (Marsh y col., 2007b). Si se seleccionan cuidadosamente las propiedades barrera, un material de envasado puede mantener una atmósfera modificada (AM) dentro del envase y por lo tanto extender la vida útil del producto alimenticio. Debido a que las frutas y verduras frescas respiran, requieren materiales, tales como el polietileno (PE), con una mayor permeabilidad a los gases. Los alimentos deshidratados deben ser protegidos de la humedad durante el almacenamiento. Las reacciones inducidas por la luz incluyen la destrucción de la clorofila, resultando en el blanqueo de vegetales; la decoloración de las carnes frescas; la destrucción de riboflavina en leche; y la oxidación de la vitamina C y pigmentos carotenoides. El uso de material que evita la exposición a la luz es uno de los medios más efectivos para prevenir el deterioro químico inducido por la luz (Singh, 2014). Además, los

## Introducción

---

envases que incorporan propiedades barrera evitan la pérdida de aroma o sabor del producto e impiden la absorción de olores externos indeseables (Frost, 2005).

- Protección biológica: los productos alimenticios están sujetos al deterioro biológico causado por el envejecimiento normal inducido por enzimas y por la descomposición microbiológica causada por bacterias, levaduras y hongos (Frost, 2005). La conservación de alimentos depende del control de estos microorganismos, insectos, roedores y otros animales, proporcionando el envase una barrera para los mismos, colaborando en la conservación del alimento y evitando, de este modo, el deterioro y la descomposición del alimento.
- Protección física: el envase protege a los alimentos de daños mecánicos y amortigua contra los golpes y vibraciones que se producen durante su distribución. Típicamente están desarrollados a partir de cartón y materiales corrugados, y son ampliamente utilizados como contenedores de carga y como envases para alimentos delicados como huevos y frutas frescas (Marsh y col., 2007b).

Otras de las funciones requeridas es la contención y reducción del desperdicio de alimentos. La mayoría de los productos deben estar contenidos antes de que se puedan mover de un lugar a otro; es decir, el

## Introducción

---

paquete debe contener el producto. Esta función de contención proporciona un gran aporte para la protección del medio ambiente ya que el envase contribuye a la reducción de los residuos sólidos totales (Frost, 2005). Si el envase presenta algún defecto, puede conducir a derrames e importantes pérdidas. Es significativo el desperdicio de alimentos que se ha reportado en muchos países, que van desde el 25% para granos hasta 50% para frutas y verduras (FAO 1989). La inadecuada conservación, protección, almacenamiento y transporte se han citado como causas de los residuos de alimentos (Rathje y col. 1985).

El marketing y la comunicación están siendo considerados cada vez más como funciones de los envases alimentarios. Un paquete es la cara de un producto y en general es lo único que el consumidor ve antes de realizar la compra. Debido a la demanda cambiante de los consumidores, se requiere una mayor capacidad para reflejar en los envases las tendencias actuales a través de diseños de mayor calidad (Frost, 2005). El envase también proporciona información para el consumidor, esto permite que se tomen decisiones fundadas sobre la compra y el uso del producto. Por ejemplo, la etiqueta del envase cumple con los requisitos legales para la identificación del producto, comunica el valor nutricional, ingredientes, peso neto y datos del fabricante. Además, el envase transmite información importante sobre el producto, tales como instrucciones de uso/eliminación, fecha de vencimiento, identificación de marca y fijación de precios. También, se debe considerar el

## Introducción

---

uso de símbolos inequívocos y estandarizados, de fácil comprensión, cuando está involucrado el comercio internacional de un determinado producto alimenticio (Marsh y col., 2007b)

La Comisión del Codex Alimentarius define la trazabilidad como "la capacidad para seguir el desplazamiento de un alimento a través de etapas especificadas de la producción, transformación y distribución" (Codex Alimentarius, 2004). La trazabilidad tiene tres objetivos: mejorar la gestión de la cadena de suministro, facilitar el rastreo del producto y diferenciar y comercializar alimentos con sutiles o indetectables atributos de calidad (Golan y col., 2004). Las empresas elaboradoras de alimentos incorporan códigos únicos en las etiquetas de los envases de sus productos; esto les permite realizar un seguimiento de los mismos a lo largo de todo el proceso de distribución (Marsh y col., 2007b).

Respecto de la conveniencia como función, el envase juega un papel importante al permitir que los productos respondan a las demandas y necesidades de los consumidores modernos (Frost, 2005). Características de conveniencia tales como la facilidad de acceso, manipulación y eliminación; la visibilidad del producto; resellado y recipientes aptos para microondas influyen enormemente la innovación del paquete. Los avances en el envasado de alimentos han facilitado el desarrollo de nuevas formas de comercio minorista que ofrecen a los consumidores la comodidad de comprar

## Introducción

---

todo en un solo lugar y tener disponible alimentos de todo el mundo. Esto no sólo agrega valor y ventaja competitiva a los productos, sino que también puede influir en la cantidad y tipo de residuos a desechar. (Marsh y col., 2007b).

La gran manipulación de alimentos ha dado lugar a características especiales de envases diseñados para reducir o eliminar el riesgo de sabotaje y adulteración. Estas características a prueba de adulteraciones no pueden ser fácilmente reemplazadas, e incluyen bandas, membranas e impresiones especiales sobre botellas o latas, tales como gráficos o textos que cambian irreversiblemente después de la apertura. Los envases con diseños contra sabotajes por lo general requieren materiales adicionales, lo que agrava los problemas de eliminación, pero los beneficios generalmente superan cualquier inconveniente (Frost, 2005).

### **I.1.1. Principales polímeros sintéticos utilizados en el envasado de alimentos**

El arte y la ciencia de los envases de alimentos han evolucionado mucho desde sus orígenes. Hoy en día, los productos a menudo están envueltos en capas múltiples de envasado para conseguir una mayor seguridad desde su fabricación hasta el posterior uso por el consumidor. Cada material de envasado ofrece diferentes ventajas. Por ejemplo, el vidrio



## Introducción

---

conserva bien el sabor y es químicamente inerte, es capaz de soportar tratamientos térmicos tales como la pasteurización y la esterilización, es impermeable a la humedad, gases, olores y microorganismos; sin embargo, la principal limitación es su susceptibilidad a la rotura, además de ser pesado y aumentar los costos del transporte. El papel y el cartón son económicos de producir y fáciles de imprimir, además son livianos, lo que reduce el combustible utilizado para el transporte de productos (Robertson, 2005); el aluminio y el acero ofrecen las ventajas de ser maleables, impermeables y fáciles de reciclar. El aluminio también puede unirse a las películas de papel o plástico para obtener una mayor versatilidad, está disponible en un amplio rango de espesor y proporciona una barrera completa a la luz, el oxígeno (O<sub>2</sub>), la humedad y las bacterias; siendo las latas de bebidas el mayor ejemplo de uso de este tipo de envases. Las principales desventajas del aluminio son su alto costo en comparación con otros metales (por ejemplo, acero) y su incapacidad para ser soldado, lo que lo hace útil solamente para fabricar recipientes sin costura. Por otro lado, el acero es un material durable, resistente a la manipulación y puede proteger el contenido contra el deterioro durante un largo tiempo. La mayoría del acero utilizado en los envases es la hojalata, que es acero que ha sido recubierto con una capa de estaño para evitar la corrosión. El acero ofrece una protección óptima frente a elementos externos, como luz, humedad y O<sub>2</sub>, es higiénico, no tóxico y conserva el sabor y características organolépticas del producto, y mantiene su frescura, sin el agregado de aditivos como antioxidantes. Sin embargo, el plástico ha

## Introducción

---

revolucionado la industria del envasado, ya que se moldea con gran facilidad en infinitas formas, es liviano, barato, fácil de sellar y duradero (Luz, 2012).

La mayoría de los avances de la sociedad humana durante el siglo pasado han sido facilitados por el uso de plásticos (North y col., 2013). En los últimos 60 años, el plástico se ha convertido en un material útil y versátil con una amplia gama de aplicaciones. Con la evolución actual de la industria del plástico, sus usos tienden a aumentar. En el futuro, el plástico podría ayudar a resolver algunos de los problemas más apremiantes del mundo, como el cambio climático y la escasez de alimentos (Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts, 2011).

Los plásticos son compuestos basados en polímeros (macromoléculas formadas por uniones covalentes de pequeñas unidades moleculares conocidas como monómeros) y varios otros productos químicos como aditivos, estabilizantes, colorantes, adyuvantes de procesamiento, etc., cuya cantidad y tipo varían de un polímero a otro ya que cada uno de los productos finales tiene que ser optimizado de acuerdo a su uso y aplicación final (Guilbert y col., 1997; Petersen y col., 1999). Hoy en día, hay más de 20 tipos diferentes de plásticos en uso en todo el mundo (APME, 2006). Por lo general, se combinan varios materiales para explotar las propiedades funcionales o estéticas de cada uno. Por ejemplo, la combinación de diferentes plásticos a través de coextrusión o laminación, o mediante la laminación de plásticos o papel con papel de aluminio (Marsh y col., 2007a).

## Introducción

---

### **I.1.1.1. Propiedades y tipos de plásticos**

Las propiedades de los plásticos son determinadas por la naturaleza física y química de los polímeros usados en su fabricación; a su vez, las propiedades de los polímeros dependen de su estructura molecular, peso molecular (PM), grado de cristalinidad y composición química (Robertson, 2013). Son varias las ventajas que se obtienen al utilizar plásticos para el envasado de alimentos. Presentan fluidez, maleabilidad y ofrecen una gran flexibilidad de diseño. Debido a que son químicamente resistentes, los plásticos son de bajo costo y livianos. La principal desventaja es su variada permeabilidad a la luz, gases, vapores y moléculas de bajo PM. Hay dos grandes categorías de plásticos: termoestables y termoplásticos (EPA, 2006). Los primeros son polímeros que presentan un fuerte entrecruzamiento, son resistentes, y una vez fabricados, no pueden ser luego remodelados a formas nuevas; son utilizados principalmente en automóviles y construcción (tales como adhesivos y recubrimientos) pero no para el envasado de alimentos. Por otro lado, los termoplásticos son polímeros lineales que se ablandan gradualmente con el incremento de la temperatura y finalmente se derriten debido a que sus cadenas moleculares se mueven independientemente. Estos polímeros pueden ser fácilmente moldeados en diferentes formas o extrusados por la ausencia de entrecruzamiento. Son los que presentan mayor

## Introducción

---

disponibilidad en el mercado y representan más de los dos tercios de todos los polímeros usados a nivel mundial (Robertson, 2013).

Si bien se han reportado algunas cuestiones relacionadas con la salud por la presencia de monómeros y componentes residuales en los plásticos, incluyendo estabilizantes, plastificantes y bisfenol A (BPA) (López-Cervantes y col., 2003), el uso de plásticos en el envasado de alimentos ha seguido aumentando debido al bajo costo de los materiales y las ventajas funcionales que presenta por sobre los materiales tradicionales como el vidrio y la hojalata (López-Rubio y col., 2004).

Aunque más de 30 tipos de plásticos se utilizan como material de envasado (Lau y col., 2000), los que más se emplean en alimentos son poliolefinas, poliésteres, cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS) y poliamida (PA). El tipo de material utilizado depende de la aplicación final requerida: botellas, recipientes, películas o recubrimientos. Con el fin de producir estas estructuras, monómeros se polimerizan a través de procesos de adición o condensación (Wagner, 2012).

1) Poliolefinas: el término poliolefinas refiere a un conjunto de plásticos basados en etileno y propileno. El PE y el polipropileno (PP) forman parte de este grupo (Wagner, 2012). El PE es uno de los plásticos más comunes en el mundo. Tiene gran importancia industrial y se produce en millones de toneladas cada año; su versatilidad combinada con sus interesantes

## Introducción

---

propiedades físicas y químicas, lo hacen un producto atractivo para producir. Basado en la estructura del polímero y su densidad, el PE se puede clasificar en polietileno de alta densidad (HDPE) y polietileno de baja densidad (LDPE) (Hedesiu, 2007). El HDPE presenta una mayor rigidez, es más opaco y tiene una mayor resistencia química y a la tracción que el LDPE, debido a la ausencia de ramificación (Fernández, 2015). El HDPE se utiliza para recipientes o botellas para alimentos tales como leche y jugos donde se necesita un material fuerte y no se requiere claridad (Li, 2007). El LDPE, debido a que presenta cierta transparencia, es utilizado básicamente en films, bolsas comerciales y recubrimientos para cartones de leche (Fernández, 2015).

El PP presenta una menor densidad y un mayor punto de ablandamiento que el PE, menor transmisión de vapor de agua, una permeabilidad media a los gases, buena resistencia química y a la abrasión, alta estabilidad térmica y claridad, y buen brillo (Robertson, 2013). El PP es un material más denso y se utiliza en envases rígidos como mamaderas y tazas debido, aunque es un poco más caro que otros plásticos (Sahin, 2005). Además, se incluyen otros usos como envases para yogurt, margarinas, bolsas para dulces y aperitivos y envases para microondas (Marsh y col., 2007).

## Introducción

---

2) Poliésteres: se incluyen en esta categoría el tereftalato de polietileno (PET), el policarbonato (PC) y el naftalato de polietileno (PEN).

El PET es un polímero termoplástico transparente, lineal, con capacidad para cristalizar bajo ciertas condiciones controladas; es rígido, firme, liviano y dúctil. Puede incrementarse su resistencia y firmeza mediante la orientación de su estructura durante el moldeo y extrusión (Robertson, 2013). Posee buenas propiedades barrera que permite conservar y proteger el contenido frente al O<sub>2</sub> y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El envase PET presenta una protección contra la transmisión de O<sub>2</sub> 40 veces mayor que los envases HDPE (NAPCOR, 2012). Las películas de PET poseen excelentes propiedades térmicas, presentan inercia química y buenas propiedades de barrera a los gases que resultan importantes para muchos productos médicos, farmacéuticos y alimenticios. El uso de tecnologías de coinyección, coextrusión, laminado o revestimiento permite combinar el PET con otros plásticos para extender sus aplicaciones, por ejemplo, lograr una protección adicional contra el O<sub>2</sub> y la humedad, evitando así la rancidez y malos sabores (Matthews, 2000).

El PC es un poliéster de cadena larga lineal que presenta una excelente combinación de alta resistencia a la temperatura y al impacto con una gran transparencia, manteniendo sus propiedades con el aumento de la temperatura. La permeabilidad a los gases y al vapor de agua, es alta, con lo cual debe ser recubierto si se necesita disminuir esta permeabilidad. El PC es usado en envases multicapas como uno de sus componentes, ya que le aporta

## Introducción

---

transparencia y resistencia principalmente a aquellos envases que son llenados en caliente o bien necesitan un procesamiento térmico luego de su llenado (Robertson, 2013). Puede ser utilizado para servir, congelar y recalentar comida en el microondas logrando reducir el tiempo y energía consumidos (Hamelton, 2015).

El PEN es una nueva generación de polímero de poliéster de alto rendimiento y alto costo con oportunidades en varios mercados, incluido el envasado, películas y fibras (Van den Heuvel, 2000). Presenta aproximadamente cinco veces menos permeabilidad frente a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y vapor de agua que el envase PET (Robertson, 2013), convirtiéndolo en el polímero adecuado para aplicaciones tales como latas para cerveza, bebidas carbonatadas y botellas que requieren llenado en caliente (Van den Heuvel, 2000). Es más resistente y más rígido que el PET (Robertson, 2013). Debido a su alto precio, su uso se justifica siempre y cuando las ventajas físicas del envase superen la desventaja de su costo (Bedia y col., 2001). El uso del PEN en envases flexibles para alimentos no sólo mejora las propiedades barrera, sino también permite la simplificación de la estructura del envase reduciendo el número de capas necesarias, que a su vez disminuye el costo total del sistema (Robertson, 2013).

3) Cloruro de polivinilo (PVC): el PVC es uno de los principales materiales termoplásticos utilizados en el envasado de alimentos en todo el

## Introducción

---

mundo (Pearson, 1982). Hay cuatro tipos básicos de PVC que se utilizan en el envasado de una amplia gama de productos alimenticios: (1) botellas: para el envasado de extractos de frutas, aceite de cocina, agua mineral; (2) láminas termoformadas rígidas: para productos de confitería, galletas, pasteles y productos lácteos; (3) films adherentes: para productos frescos como carne, pollo, frutas, verduras y quesos; (4) tapas selladoras: para bebidas carbonatadas y conservas (Leadbitter, 2003).

El PVC, un polímero altamente versátil, es compatible con muchos aditivos, siendo éste su mayor beneficio. El PVC sin modificar tiene poco brillo y es difícil de procesar porque presenta una baja resistencia al calor. Sin embargo, debido a su naturaleza polar, el PVC presenta gran afinidad por los plastificantes y puede ser considerablemente modificado (Abdel-Bary, 2003). Rara vez se utilizan estos polímeros vírgenes y típicamente se mezclan con diversos aditivos para mejorar el rendimiento. Estos aditivos incluyen rellenos inorgánicos como carbono y sílice que refuerzan el material, plastificantes para volver el material más flexible, estabilizadores térmicos y ultravioleta, modificadores de impacto y colorantes (Thompson y col., 2009). Además, es barato, químicamente estable y no se polimeriza, es muy resistente a las condiciones ambientales y se degrada muy lentamente. Por otro lado, estas mismas propiedades son lo que lo hace un material peligroso en lo que se refiere al medio ambiente. Debido a la cantidad y diversidad de aditivos añadidos al PVC (puede contener hasta un 60%) y a su



## Introducción

---

contenido de cloro, su disposición final o reciclaje es una cuestión a tener en cuenta (LENNTECH, 2015).

4) Poliestireno (PS): las aplicaciones típicas incluyen envases de protección tales como cartones para huevos, contenedores, tapas desechables, tazas, platos, botellas y bandejas de comida. (Marsh y col., 2007a). El PS es un polímero aromático sintético hecho a partir del monómero estireno y puede ser rígido o espumado. El PS de uso general es duro y quebradizo. Es un polímero de bajo costo por unidad de peso. Respecto de sus propiedades físicas, presenta alta permeabilidad al O<sub>2</sub> y al vapor de agua, y tiene un bajo punto de fusión. El PS es naturalmente transparente, pero puede ser coloreado adicionando colorantes. El PS ha sido reconocido como una solución versátil y rentable para los envases rígidos y desechables para alimentos (Faes, 2015).

5) Poliamida (PA): comúnmente conocido como nylon (nombre de la marca dado a una gama de productos fabricados por DuPont), las poliamidas fueron originalmente usadas en textiles. Los diferentes tipos de PA se caracterizan por un número que se refiere al número de carbonos en el monómero original. Ofrecen buena resistencia química, dureza y baja permeabilidad a los gases (Marsh y col., 2007b).

Las resinas de PA tienen una amplia gama de aplicaciones en particular como una de las capas que, por coextrusión, con otros polímeros

## Introducción

---

forman películas para el envasado de alimentos tales como carnes cocidas, ayudando a mantener los alimentos frescos y en condiciones atractivas (PAFA, 2015).

### **I.1.1.1.1. Producción y consumo**

El consumo actual mundial de plásticos es más de 200 millones de toneladas, con un crecimiento anual de aproximadamente el 5%, lo que representa el mayor campo de uso para el petróleo crudo (Hernández, 2013). Esto enfatiza la gran dependencia de la industria del plástico del petróleo y en consecuencia cómo el aumento en el precio del petróleo crudo puede tener una influencia económica en el mercado del plástico (Sorrentino y col., 2007). Está siendo cada vez más importante utilizar materias primas alternativas. Hasta ahora los plásticos a base de petroquímicos tales como PET, PVC, PE, PP, PS y PA se han utilizado cada vez más como materiales de envasado debido a su gran disponibilidad, su costo relativamente bajo y sus buenas propiedades mecánicas tales como resistencia a la tracción, buena barrera al O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y compuestos anhídridos y aromáticos, capacidad de sellado térmico, etc. Pero hoy en día su uso debería ser limitado ya que no son totalmente reciclables y/o biodegradable por lo que plantean serios problemas ecológicos (Sorrentino y col., 2007). Como consecuencia, varios miles de toneladas de material plástico se depositan en los vertederos, aumentando cada año el problema de la eliminación de este tipo de residuos

## Introducción

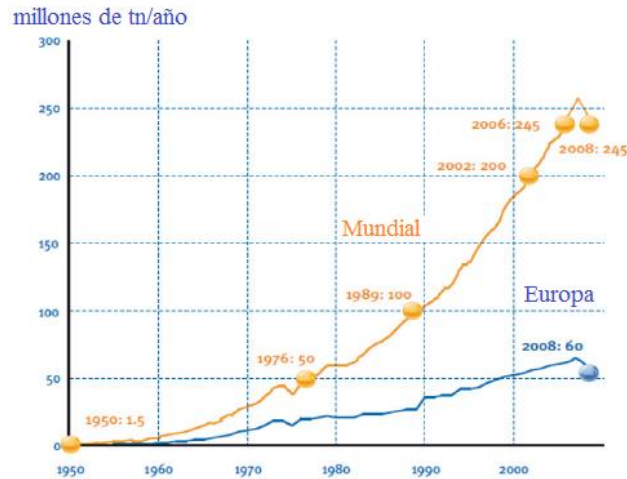
---

(Kirwan y col., 2003). Sin embargo, la diversidad de polímeros y la versatilidad de sus propiedades hacen que la producción de plásticos haya aumentado sustancialmente en los últimos 60 años, de aproximadamente 0,5 millones de toneladas en 1950 a más de 260 millones de toneladas en la actualidad (Thompson y col., 2009).

En la figura 1 se presentan los datos de producción anual de plásticos a nivel mundial desde el año 1950. En 2009, se produjeron alrededor de 230 millones de toneladas de plástico y alrededor del 25% de estos plásticos se utilizaron en la Unión Europea (UE) (Mudgal y col., 2011). Esta cifra global ha aumentado a una tasa promedio de 9% desde 1950 a un máximo de 245 millones de toneladas en 2008, después de lo cual se produjo un ligero descenso de la producción. La recesión económica puede haber sido la responsable de este ligero descenso de la producción de plástico (PlasticsEurope, 2010).

## Introducción

---



**Figura 1.** Producción de plásticos a nivel mundial 1950-2008 (adaptado de *Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts*, 2011).

Alrededor del 50% del plástico se utiliza para aplicaciones descartables, tales como envases y artículos de consumo desechables (Hopewell y col., 2009).

La producción de plástico se ha estabilizado en los últimos años, sin embargo, no está disminuyendo e inclusive se estima que aumentará en el futuro debido al incremento en la demanda y su uso creciente en economías emergentes y en desarrollo (Global Industry Analysts, 2011).

## Introducción

---

### **I.1.1.1.2. Efecto sobre el medio ambiente y la salud**

La sociedad enfrenta hoy, en la “era de los plásticos”, serios problemas ambientales y de salud debido al impacto del excesivo consumo de plásticos y al hecho de que la eliminación de los mismos no fue considerada hasta después de que se presentó la producción en masa de estos polímeros sintéticos (North y col., 2013).

Los materiales plásticos que se utilizan actualmente para el envasado de alimentos no son biodegradables, lo que lleva a un problema cada vez más grande para el medio ambiente y es causa de preocupación en lo que se refiere a su acumulación en el planeta. Incluso al no ser biodegradable finalmente, se romperá en fragmentos más pequeños produciendo los llamados "microplásticos", que presentan un impacto significativo para la salud tanto para las especies marinas como para el ser humano (Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts, 2011).

La mayoría de estos materiales no son tóxicos por sí mismos, sin embargo, pueden resultar ser una problemática grave para el medio ambiente por variadas razones:

- Su eliminación mediante procesos de combustión origina especies químicas tóxicas y/o corrosivas, además de los aditivos que se usan para mejorar las propiedades de los plásticos.
- Su acumulación masiva, tanto en la tierra como en el agua, ha comenzado a originar una serie de accidentes en animales, como atragantamiento, asfixia y

## Introducción

---

atrapamiento con restos de estos materiales (Velásquez, 2006). Investigaciones recientes reportaron la presencia de 3 a 5 kg/km<sup>2</sup>, con registros de hasta 30 kg/km<sup>2</sup>, con cantidades que van en aumento cada año. Además, los plásticos contienen compuestos químicos tóxicos como bifenilos policlorados, diclorodifenil dicloroetano y nonilfenoles, que se añaden durante su fabricación o bien se absorben del medio ambiente ya que no son solubles en agua y por esta razón se adhieren y se fijan en los plásticos (Espín, 2007). Recientes estudios de modelos matemáticos han demostrado que los plásticos tienden a fragmentarse en partículas más pequeñas, ayudados por la acción de los rayos ultravioleta (UV), las olas y el viento, y podrían facilitar el transporte de los contaminantes hacia los organismos después de la ingestión. Esto podría presentar una ruta directa para el transporte de productos químicos a los animales superiores, como las aves marinas (Teuten y col., 2007, 2009). Por lo tanto, el potencial de los fragmentos de plásticos para transportar y liberar productos químicos hacia la vida silvestre es un área emergente de preocupación. Ya hay evidencia clara de que los productos químicos asociados con el plástico son potencialmente perjudiciales para la vida silvestre. Los datos, recogidos y resumidos por Oehlmann y col. (2009), muestran que afectan la reproducción en todos los grupos de animales estudiados, como crustáceos y anfibios, e interfieren en la función hormonal (Hu y col., 2009).

Una cantidad desproporcionada de los residuos en el medio marino corresponde a los plásticos. Éstos constituyen aproximadamente el 10% de

## Introducción

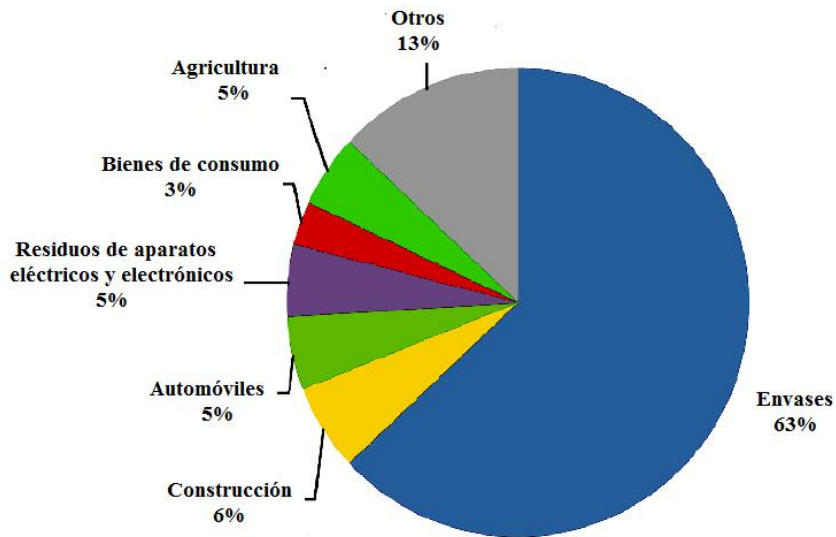
---

los residuos domésticos, la mayoría de los cuales se dispone en rellenos sanitarios (Barnes y col., 2009; Hopewell y col., 2009). Sin embargo, entre el 60% y 80% de los residuos encontrados en las playas, que flota en el océano o están en el fondo marino, son plásticos (Derraik, 2002; Barnes y col., 2005).

A fin de poder identificar las fuentes de los residuos de plástico, se plantea una categorización en función del momento en que se generan los residuos, clasificándolos como residuos plásticos pre y post-consumo. Los residuos pre-consumo son aquellos que se producen durante la fabricación, mientras que, los residuos post-consumo se producen después de que un producto se consume o se usa; siendo los primeros, pequeños pellets que se utilizan para hacer objetos de plástico más grandes. La mayoría de las estadísticas están aplicadas a los residuos plásticos post-consumo. Así, en 2008, Noruega y Suiza estimaron que se generó un total de 24,9 Mt de residuos plásticos post-consumo (PlasticsEurope, 2009), los cuales fueron categorizados luego según su función (figura 2).

## Introducción

---



**Figura 2.** Proporción de residuos plásticos post-consumo clasificados según su función (adaptado de *Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts, 2011*).

En el mar, los residuos plásticos a menudo se clasifican en macro (más de 20 mm de diámetro), meso (diámetro entre 5 y 20mm) y microplásticos (de 5 mm a 333  $\mu\text{m}$  de diámetro); siendo estos últimos los que generan un problema importante y tienen un mayor impacto a nivel físico y químico en los ecosistemas y la salud humana. Los microplásticos son apenas detectables, son más difíciles de controlar y tienen una mayor superficie expuesta por su relación tamaño/volumen (Arthur y col., 2009).



## Introducción

---

Es difícil estimar el riesgo de ingestión crónica de contaminantes de envasado de alimentos, y es aún más difícil poder estimar el impacto para la salud pública que podría ser el resultado de la ingestión de plásticos ya que hay una escasez de datos objetivos respecto de este tema (Luz, 2012).

Se sabe que los residuos plásticos producen un impacto negativo en la salud de los ecosistemas y de los seres humanos. Algunos de ellos son más evidentes y claramente demostrados como, por ejemplo, el atragantamiento de la fauna marina. Otros son más sutiles y no se comprenden bien, tales como el transporte de contaminantes por los residuos plásticos (Derraik, 2002; Gregory, 2009).

Respecto de la ingestión de desechos plásticos, el daño ocasionado a la fauna variará, dependiendo de su sistema digestivo, la cantidad y el tipo de plástico ingerido y la etapa de desarrollo del animal. Un efecto importante de la ingesta es que se reduce el apetito, ya que hace que el estómago se sienta lleno. Esto puede llevar a que los animales se mueran de hambre. Spear, Ainley y Ribic (1995) proporcionaron evidencia de que cuanto mayor es el número de partículas de plástico ingerido, peor es el estado físico en que se encuentran las aves marinas. La ingestión de plástico puede causar, además, efectos más graves como obstrucción del tracto digestivo y lesiones internas.

Los impactos específicos de la ingesta de microplásticos es una preocupación cada vez mayor y también un área que no está bien entendida (Browne y col., 2008), ya que es difícil cuantificar los microplásticos presentes en los tejidos animales. Estudios experimentales han revelado que

## Introducción

---

anfípodos y gusanos marinos ingieren microplásticos (Thompson y col., 2004), demostrando también que estas partículas más pequeñas tienen un mayor potencial para la acumulación en los tejidos de los organismos.

Un impacto menos conocido que podría resultar de la ingestión y el manejo inadecuado de los residuos, es el impacto de los productos químicos en los seres humanos y los ecosistemas. El plástico contiene varios productos químicos con potencial tóxico y también tiene el potencial de transportar contaminantes (Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts, 2011). Los polímeros están compuestos de subunidades de repetición o monómeros y se ha encontrado que algunos de los principales plásticos, como el PVC y el PS, liberan monómeros tóxicos vinculados al cáncer y a problemas reproductivos (Marcilla y col., 2004; Garrigos y col., 2004). A menudo, durante la producción del plástico, las reacciones de polimerización no se completan y los monómeros sin reaccionar se pueden encontrar en el material final. Lithner, Larsson y Dave (2011) realizaron un ranking de riesgo ambiental y de salud de los 55 polímeros basados en la clasificación de riesgo de sus monómeros según reglamento de la UE. Treinta y uno de ellos fueron monómeros que presentan los peores niveles de peligro y tienen una alta producción anual a nivel mundial. El estudio indicó que el PVC debe recibir una atención especial, ya que contiene un monómero cancerígeno y se produce mundialmente en grandes cantidades. El estudio no incluyó a los riesgos derivados de los aditivos, con lo cual podría aumentar el ranking de riesgo de muchos polímeros.

## Introducción

---

Como se mencionó anteriormente, los plásticos contienen productos químicos o aditivos que le confieren ciertas propiedades particulares. Hay una amplia gama de aditivos, pero los más relevantes para la ecología y la salud humana son los siguientes:

- BPA: es un monómero que se utiliza para fabricar plástico policarbonato, latas de alimentos y bebidas, botellas de agua, mamaderas y muchos otros productos de consumo masivo. Numerosas investigaciones generaron evidencia sobre la asociación de este aditivo con enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, cambios hormonales en adultos (Lang y col., 2008; Galloway y col., 2010; Melzer y col., 2010), cáncer de próstata, cáncer de mama, aborto involuntario y obesidad (Oehlmann y col., 2009).

- Ftalatos: son un grupo de productos químicos industriales utilizados como plastificantes, que hacen que los plásticos, tales como PVC, sean más flexibles o elásticos. Su uso está muy extendido y se encuentra en artículos como juguetes, envases de alimentos, mangueras, cortinas de baño y piso de vinilo. Los ftalatos de alto PM son los que se utilizan principalmente como plastificantes, mientras que aquellos de bajo PM se utilizan como solventes en productos de cuidado personal. Esto significa que las fuentes de ftalatos en el medio ambiente son numerosas. Se ha demostrado que ciertos ftalatos funcionan como disruptores endocrinos y tienen actividad anti-androgénica (Talness y col, 2009; Meeker y col., 2009).

## Introducción

---

- Retardantes de flama bromados: se consideran necesarios en los plásticos por razones de seguridad. Ejemplos de estos son los ésteres bifenílicos polibromados (PBDE) y tetrabromobisfenol A (TBBPA). Se añaden a una variedad de productos de consumo, incluidos los textiles y termoplásticos utilizados en la electrónica. Los estudios indican que los PBDE y TBBPA tienen efectos bloqueadores de hormonas, y que la exposición a los PBDE perjudica el desarrollo del sistema reproductivo y nervioso (DiGangi y col., 2010).

Los posibles efectos nocivos de estos productos químicos han sido documentados ya que están presentes en el ambiente y dentro de los sistemas biológicos de la vida silvestre y los seres humanos. Si bien hay una cierta variación entre los diferentes grupos demográficos, es de especial preocupación la mayor concentración de BPA y ftalatos en los niños pequeños (Koch y col., 2009).

El manejo adecuado de residuos es importante para proteger la salud humana y el medio ambiente, y para preservar recursos naturales. Directrices de la Environmental Protection Agency (EPA) para la gestión de residuos sólidos (EPA, 1989) hacen hincapié en una gestión integrada donde engloba la reducción en la fuente, el reciclaje, el compostaje, la combustión y el depósito en vertederos.

- Reducción de fuentes: significa la prevención de residuos, es decir, la reducción de la cantidad y/o toxicidad de los residuos, cambiando por

## Introducción

---

ejemplo el diseño, el proceso de fabricación, la compra o el uso de materiales originales.

- **Reciclaje:** implica reprocesar el material en nuevos productos. Un programa de reciclaje típico implica no sólo la recolección, clasificación y transformación, sino también la fabricación y venta de materiales y productos reciclados.
- **Compostaje:** considerado por EPA como una forma de reciclaje, es la degradación biológica de materiales orgánicos, tales como alimentos. En consecuencia, implica organizar el material orgánico en pilas y proporcionar suficiente humedad para la descomposición aeróbica por microorganismos.
- **Combustión:** la quema controlada de residuos es una alternativa atractiva para los residuos que no pueden ser reciclados o compostados, logrando producir vapor, calor o generar electricidad (Kiser y col., 2004).
- **Vertido:** ofrece el medio ambiente eliminación racional de los residuos de las operaciones de reciclaje y combustión. Los vertederos de hoy son estructuras cuidadosamente diseñadas en la que los residuos están aislados del medio ambiente y de las aguas subterráneas (Marsh y col., 2007a).

### **I.2. Vegetales mínimamente procesados**

Los hábitos alimenticios pueden variar en diferentes partes del mundo; sin embargo, en algunos aspectos la producción y consumo de alimentos son universales, tales como el consumo de vegetales mínimamente

## Introducción

---

procesados (MP), también conocidos como productos frescos cortados, de cuarta gama o listos para consumir (Horticultura Internacional, 2009). Según una investigación de mercado realizada en 66 países, que representan más del 75% de los consumidores en el mundo, la demanda mundial de alimentos listos para el consumo, entre los que se encuentran los vegetales MP, aumentó un 4% entre 2005 y 2006. Durante ese mismo período, el crecimiento en las ventas de ensalada fresca y lista para el consumo aumentó un 10% (Silva y col., 2012). Este aumento se debe a la creciente popularidad de que las frutas y verduras MP proporcionan mayores beneficios para la salud. Además, la tendencia actual es la de consumir productos seguros, de buena calidad y listos para el consumo (Alzamora y col., 2000). La demanda de frutas y verduras MP ha sufrido un rápido incremento en Europa y Estados Unidos, donde la demanda se espera que represente el 25% del mercado total de alimentos en el futuro cercano (Valverde y col., 2010). Actualmente, la oferta de productos MP está compuesta principalmente por hortalizas como lechuga, espinaca, zanahoria, coliflor, brócoli y cebolla, como productos individuales o en mezclas. Estas constituyen entre el 80-90% de la oferta total de estos productos con una vida útil promedio de 10 a 14 días (Salinas-Hernández y col., 2007).

Las frutas y verduras mínimamente procesadas se desarrollaron en la década de 1980 para responder a la demanda emergente de los consumidores, por la comodidad y los aspectos de calidad (Del Nobile y col., 2008). Sin embargo, los envases biodegradables todavía representan un nicho de

## Introducción

---

mercado debido a los costos y el pobre rendimiento global de las películas cuando se compara con los materiales del plástico tradicional (Del Nobile y col., 2009).

Las frutas o verduras MP se han definido como "cualquier fruta o vegetal, o cualquier combinación de ellos, que ha sido alterado físicamente de su forma original, pero se ha mantenido en su estado fresco" (IFPA, 1999).

El procesamiento mínimo de frutas y verduras frescas tiene un doble propósito:

- 1) Mantener el producto fresco, es decir, suministrar el producto en una forma conveniente sin perder su calidad nutricional.
- 2) Dar al producto una suficiente vida útil para que sea factible su distribución hasta el consumidor (Garret, 1994). Se considera que el procesamiento mínimo debería ser visto como un procesamiento "invisible". Considerando la calidad microbiológica, sensorial y nutricional, la vida de almacén de los productos MP debería ser por lo menos 4 a 7 días, o incluso más tiempo, hasta 21 días dependiendo del mercado; siendo la pérdida de ácido ascórbico y carotenos el principal factor limitante de la calidad nutricional (Ahvenainen, 1996; Wiley, 1994).

El mayor desafío que está enfrentando la industria es el rápido deterioro de la calidad y la reducción de la vida útil de los productos MP comparados con los vegetales enteros debido a los desórdenes fisiológicos y descomposición (Jacksens y col., 2002).

## Introducción

---

El procesamiento mínimo aplicado a los vegetales puede incluir cualquier operación unitaria (lavado, selección, pelado, cortado, reducción de tamaño, envasado, etc.) que se utiliza antes del escaldado en una línea de procesamiento convencional (Howard y col., 1995).

La calidad de los productos frescos cortados depende principalmente de las variedades que se utilicen, las prácticas antes y después de la cosecha, factores climáticos, métodos de cosecha, procesado y equipos utilizados para su preparación (Horticultura Internacional, 2009). Las actividades realizadas durante el procesamiento mínimo de los productos frescos pueden causar daño a los tejidos de la planta, que se acumulan durante las etapas sucesivas de procesamiento. Por lo tanto, el daño a los productos durante este procesamiento afectará negativamente su vida útil, siendo más corta en comparación con los mismos productos que no están mínimamente procesados (Silva y col., 2012). Los vegetales MP son altamente perecederos debido a que los tejidos internos están expuestos y generalmente pierden la piel o cutícula que los recubre y protege. Además, el metabolismo de los tejidos es acelerado por el daño físico causado por etapas como el pelado o cortado (Watada y col., 1996). Los principales síntomas de deterioro incluyen cambios en la textura (debido a pérdida de agua), en el color (debido al oscurecimiento enzimático en la superficie de corte), pérdida de nutrientes y rápido desarrollo microbiano (Salinas-Hernández y col., 2007).

Las frutas y hortalizas frescas son productos perecederos porque tienen una tendencia inherente a deteriorarse por razones fisiológicas y por la



## Introducción

---

invasión de plagas, infecciones y enfermedades. Las pérdidas postcosecha pueden ocurrir en cualquier etapa del proceso de producción, distribución, venta y consumo, se pueden iniciar durante la cosecha, el acopio, distribución y finalmente cuando el consumidor compra y utiliza el producto. En los países en desarrollo en donde existe una gran deficiencia en la infraestructura, las pérdidas postcosecha de productos frescos varían entre 25 a 50% de la producción. En los últimos diez años se han logrado sustanciales reducciones en las pérdidas postcosecha de granos básicos, carnes, productos lácteos y otros, pero las pérdidas de frutas y hortalizas frescas escasamente se han reducido (FAO, 1989).

Existen numerosos factores que afectan a la calidad postcosecha y la vida útil de frutas y verduras, incluyendo la madurez de cosecha, variedad, el clima y el suelo y los productos químicos aplicados (Thompson, 2003). Factores climáticos, especialmente la luz y la temperatura, tienen fuertes influencias en la composición y la calidad nutricional de las frutas y verduras. Aquellos productos que constantemente están expuestos al sol pueden tener diferentes calidades y características postcosecha que aquellos que crecieron en la sombra (Oosthuyse 1998; Ferguson y col., 1999).

Las frutas y hortalizas frescas son generalmente las más susceptibles al deterioro postcosecha ya que se producen cambios fisiológicos como la senescencia y la maduración, incluyendo ablandamiento de tejidos, aumento de nivel de azúcar, y disminución en los niveles de ácidos orgánicos, la degradación de clorofila acompañado por la síntesis de antocianinas o

## Introducción

---

carotenoides sobre la maduración, la producción y las pérdidas de compuestos de sabor volátiles, disminución del contenido fenólico y de aminoácidos, y la descomposición de los materiales celulares debido a la respiración (Sharma y col., 2000). También, pueden sufrir daños físico-mecánicos causados por magulladuras por roce, compresión o impacto, daño químico y descomposición por microorganismos (Infoagro, 2015). Las lesiones físicas aceleran la pérdida de agua y de vitamina C, y aumentan la susceptibilidad a la podredumbre por hongos o agentes patógenos durante el almacenamiento (Sharma y col., 2000; Kader, 2002).

La temperatura, la humedad relativa (HR) y la atmósfera que rodea al producto, afectarán directamente la respiración y la transpiración postcosecha de las frutas y verduras. La tasa de respiración aumenta sustancialmente a medida que se incrementa la temperatura (Watada, y col., 1996), llevando esto a un aumento de la producción de etileno y de CO<sub>2</sub>, provocando cambios en el sabor, color, textura, apariencia y nutrientes de los productos (Kader, 1985). Es importante tener un buen control de la HR que rodea al alimento ya que una HR alta podría generar un ambiente ideal para el crecimiento de microorganismos. Además, hay que considerar que la atmósfera generada (nivel de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) no debe causar daños en el producto, con lo cual es imprescindible permitir una suficiente permeabilidad a estos gases (Watada y col., 1999).

Se estima que a nivel mundial las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas causadas por microorganismos, son del orden de 5-25% en países

## Introducción

---

desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. La diferencia en la magnitud del daño de ambos escenarios obedece a que en los países desarrollados prevalecen condiciones ambientales de temperatura y humedad menos favorables para la ocurrencia de daños, tienen mayor disponibilidad de recursos tecnológicos y económicos para prevenir este tipo de pérdidas y los mercados son más exigentes. La presencia de daños mecánicos en la superficie del producto, es casi un requisito obligatorio para el desarrollo de muchas enfermedades causadas por hongos durante la postcosecha debido a que son la vía para penetrar al interior. En el caso de las bacterias, la única vía de entrada al interior de las frutas y hortalizas es a través de heridas y de aberturas naturales existentes. Como resultado de lo anterior, la mayoría de las infecciones postcosecha de frutas y hortalizas ocurren como consecuencia de los daños en su integridad física que sufren durante y después de la cosecha (Infoagro, 2015).

La zanahoria (*Daucus carota* L) es una de las hortalizas más populares cultivadas en todo el mundo y es la fuente más importante de carotenoides de la dieta de los países de occidente (Block, 1994; Torronen y col., 1996). En los últimos años, el consumo de zanahoria y sus productos han aumentado de manera constante debido a su reconocimiento como una fuente importante de antioxidantes naturales, además, de la actividad anticancerígena del  $\beta$ -caroteno siendo un precursor de la vitamina A (Sharma y col., 2012). La zanahoria es rica en  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico y tocoferol, y es clasificada como un alimento vitamínico (Hashimoto y col., 2004).

## Introducción

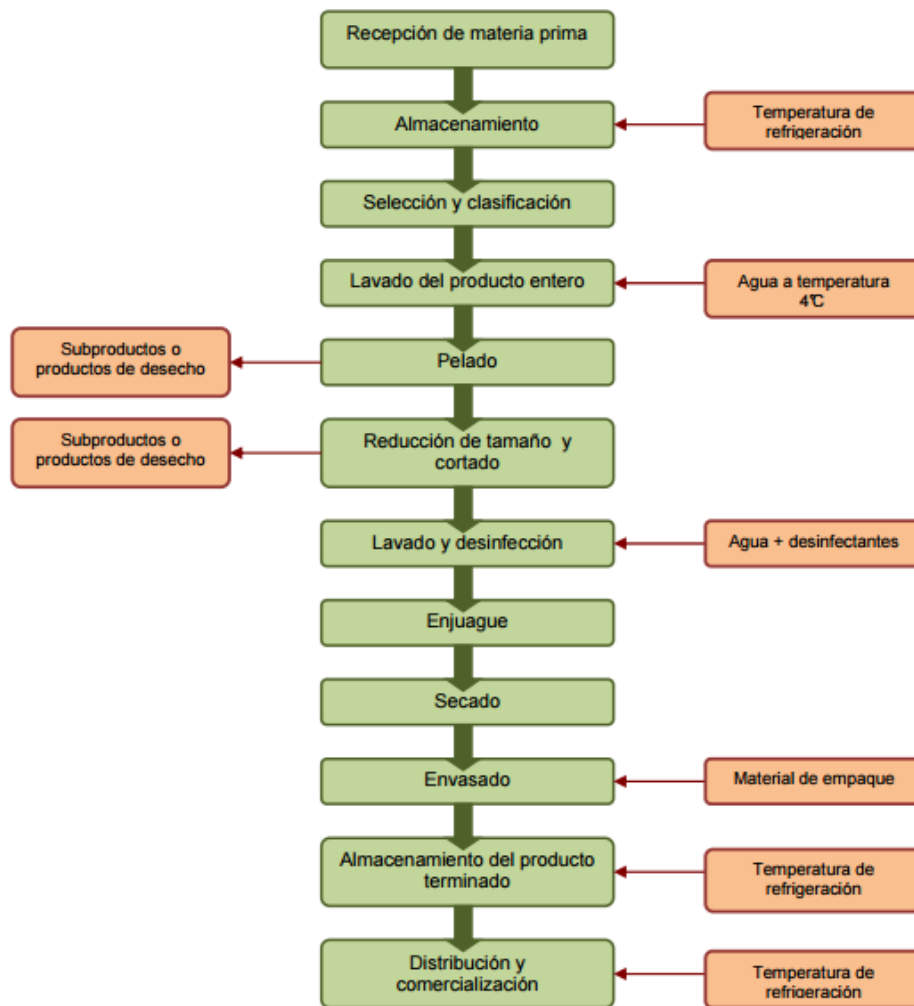
---

Debido a su relevante variedad y contenido de diferentes compuestos presentes, la zanahoria es considerada como un alimento funcional con gran cantidad de propiedades que promueven la salud del consumidor (Hager y col., 2006).

Sin embargo, la zanahoria es una hortaliza muy sensible respecto de las influencias internas y externas que afectan la calidad de la misma. Durante toda la cadena de producción, desde la siembra hasta el consumo, las zanahorias están expuestas a factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de diferentes maneras (Seljasen y col., 2013). Estos factores, como se mencionó anteriormente, se clasifican según se producen antes de la cosecha (pre cosecha), luego de que la verdura ha sido cosechada (post cosecha) o durante el procesamiento. El factor genético está relacionado con compuestos químicos importantes para las características sensoriales y aspectos relacionados con la salud (Alasalvar, y col., 2001; Bajaj y col., 1980; Da Silva y col., 2007). Además, los factores climáticos tales como la temperatura y precipitación (Simon y col., 1979), el sistema de producción (orgánico frente a convencional) (Soltosft, y col., 2010; Lima y col., 2008), la fertilización, la absorción de los componentes presentes en el suelo (Guttormsen y col., 1995), así como los tratamientos post cosecha (Simon y col., 1983; Faller y col., 2009), siendo la manipulación, el almacenamiento y el procesamiento las operaciones críticas que afectan la calidad sensorial y nutricional de las zanahorias (Seljasen y col., 2013).

## Introducción

Las primeras operaciones en el procesamiento de zanahorias MP son el lavado y pelado (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de flujo de procesamiento mínimo de vegetales  
(Parzanese, 2011)

## Introducción

---

Se ha demostrado que las lavadoras tradicionales de zanahorias aumentan el riesgo de infección por patógenos de las plantas. Además, en comparación con el lavado manual, el lavado con máquina aumentó el sabor amargo, así como el sabor a tierra (Seljasen y col., 2001); con lo cual, la etapa siguiente de pelado debe hacerse lo más rápido posible para evitar el desarrollo de sabores desagradables. Hay que considerar, además, que la etapa de pelado aumenta la tasa respiratoria y la contaminación microbiana, y afecta el pH, por lo tanto, influye en los aspectos de seguridad y vida útil del alimento. Micrografías de la superficie pelada confirmaron que la abrasión generada debido al pelado fue la que provocó el mayor daño (Barry-Ryan y col., 2000). La etapa de reducción de tamaño y cortado son operaciones donde causan daños mecánicos y modificaciones metabólicas y fisiológicas que a su vez pueden ocasionar el rápido deterioro del tejido vegetal. La etapa crítica del proceso es el lavado y desinfección, ya que su resultado influye directamente en la inocuidad y vida útil del producto final. Su objetivo es enfriar los vegetales luego de la etapa de corte y eliminar los exudados celulares que se producen tras esa operación y que pueden favorecer el crecimiento microbiano, por lo que se emplea abundante agua clorada (Parzanese, 2011).

## Introducción

---

### **I.3. Recubrimientos biodegradables**

Los recubrimientos biodegradables se preparan a partir material comestible que actúa como una barrera para los factores externos (tales como humedad, aceites, gases y vapores) y por lo tanto protegen el producto, extienden su vida útil y mejoran su calidad (Arancibia y col, 2013).

Según se mencionó, las frutas y verduras se mantienen como tejidos vivos hasta el momento en que se consumen frescos, se cocinan para ser consumidas o son procesadas para su conservación. Las frutas y verduras MP son esencialmente tejidos heridos, lo que lleva directamente a su ablandamiento, decoloración sobre superficies de corte y descomposición. Los cambios en el tejido como consecuencia de la herida son afectados por una serie de factores como la especie y variedad, concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, presión de vapor de agua y presencia de inhibidores (Brecht y col., 2004).

El concepto de usar recubrimientos biodegradables para extender la vida útil y proteger este tipo de productos de los efectos ambientales nocivos, se ha acentuado por el hecho de la necesidad de obtener alimentos de alta calidad y del aumento de la demanda de tecnologías de procesamiento y almacenamiento mínimas. Cabe mencionar que estos recubrimientos pueden ser usados como vehículo de sustancias funcionales tales como antioxidantes, antimicrobianos, nutrientes y sabores para mejorar aún más la estabilidad de los alimentos, la calidad, la funcionalidad y la seguridad (Krochta y col., 1997; Debeaufort y col., 1998; Min y col., 2005). Actualmente el uso de

## Introducción

---

recubrimientos comestibles es la técnica más novedosa y prometedora para alargar la vida útil de los productos MP por los beneficios que aporta. Además, dan soporte estructural al alimento ayudando a conservar su textura, limitando la pérdida de humedad y salida de fluidos del producto fresco cortado (Horticultura Internacional, 2009). Los recubrimientos biodegradables que se encuentran en contacto con las superficies erosionadas de las frutas y verduras MP pueden minimizar la deshidratación del producto, crear una atmósfera interna con el fin de retardar la senescencia y/o actuar como una barrera contra la putrefacción y los microorganismos patógenos (Howard y col., 1995).

Estos recubrimientos han sido utilizados para mantener la calidad y prolongar la vida útil de algunas frutas y verduras frescas, como cítricos, manzanas, pepinos (Baldwin y col., 1996; Li y col., 1998), zanahorias, tomates (Durango y col., 2006; Simoes, 2009; Wójcik y col., 2008; Casariego y col., 2008) frutillas, duraznos (Han y col., 2004a, 2004b; Park y col. 2005; Togrul y col., 2004), etc.

El recubrimiento por inmersión es el método comúnmente utilizado para frutas, verduras y productos cárnicos. El alimento se sumerge directamente en la solución formadora de film, se remueven los excesos y se deja secar al aire, de esta manera se forma sobre la superficie de los productos, una delgada membrana uniforme y semipermeable (Tharanathan, 2003).



## Introducción

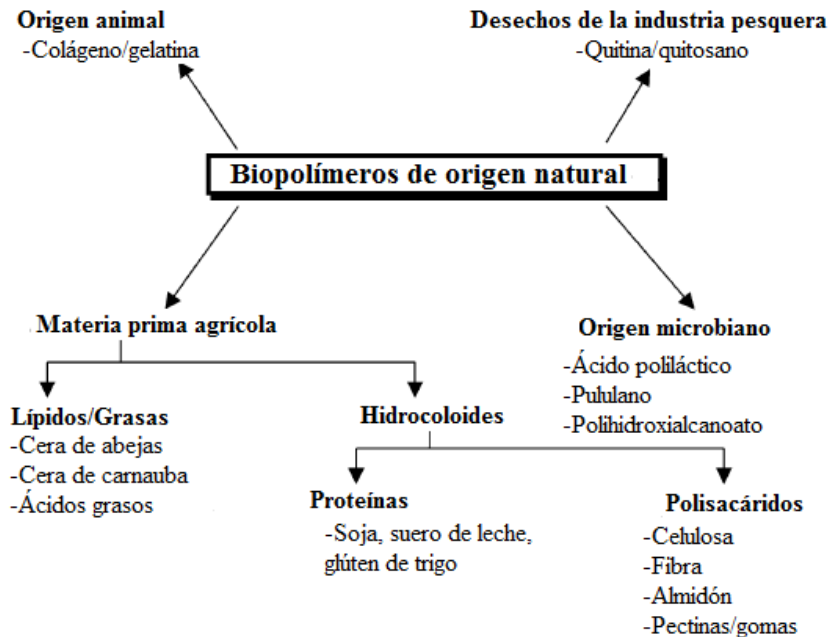
---

Los polímeros biodegradables se han defendido como alternativa al plástico y su producción ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Sin embargo, la producción a escala industrial es más cara y representa menos del 1 por ciento de la producción de plásticos (Song y col. 2009).

Una variedad de materiales comestibles, incluyendo lípidos (aceites vegetales, ceras, etc.), polisacáridos (celulosa, Ch, pectinas, almidón, alginatos, carboximetilcelulosa, etc), y proteínas (caseína, colágeno, proteínas de suero, de soja, etc.), solos o en combinación, se han utilizado para formular diferentes tipos de recubrimientos (Ukai, y col., 1976; Kester y col., 1986). Diversos materiales biopoliméricos de origen natural se utilizan en las formulaciones de los recubrimientos, tal como se muestra en la figura 4, siendo estas biomoléculas compatibles entre sí y con otros hidrocoloides, agentes tensioactivos y aditivos (Tharanathan, 2003). Las características físicas y químicas de los biopolímeros tienen una gran influencia en la funcionalidad de los revestimientos resultantes (Sothornvit y col., 2000).

## Introducción

---



**Figura 4.** Biopoliméricos de origen natural usados, solos o en combinación, para formular recubrimientos biodegradables (adaptado de *Tharanathan, 2003*)

Numerosos estudios e investigaciones se han presentado respecto de utilizar recubrimientos y películas biodegradables como alternativa a los materiales poliméricos tradicionales, posiblemente en combinación con diferentes técnicas de recubrimiento, aplicados a frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Galgano y col., 2015). Los recubrimientos biodegradables pueden plantearse como un complemento de los envases

## Introducción

---

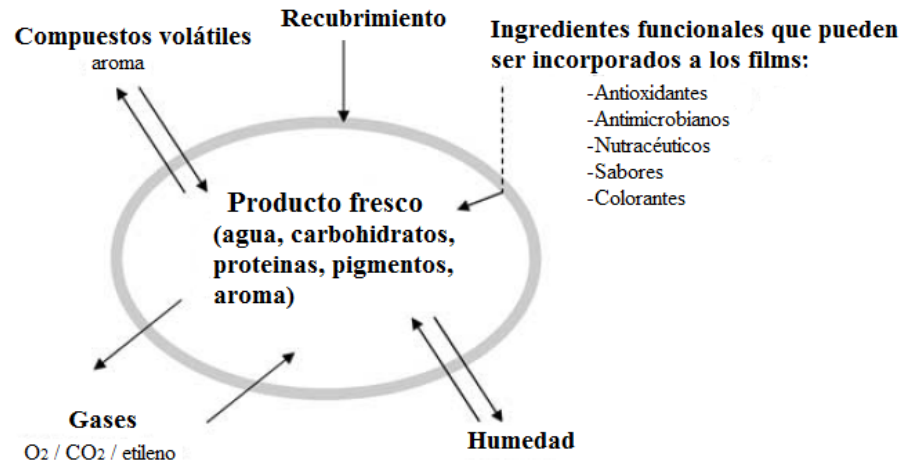
utilizados actualmente ayudando a mantener y mejorar la calidad de los productos frescos, y aumentar su valor nutricional y vida útil de anaquel.

Los requisitos esenciales que deben cumplir los recubrimientos biodegradables (Lin y col., 2007) son (Figura 5):

- 1) Proporcionar una barrera contra la humedad a fin de minimizar el problema de la pérdida de humedad, pérdida de peso y cambios en la textura, sabor y apariencia.
- 2) Proporcionar una barrera selectiva a los gases ( $O_2$ ,  $CO_2$  y vapor de agua) para controlar el intercambio gaseoso entre los productos frescos y su atmósfera circundante. De esta manera, se retardaría la oxidación enzimática, la decoloración y el ablandamiento durante el almacenamiento.
- 3) Restringir el intercambio de compuestos volátiles entre el producto fresco y su entorno a través de propiedades barrera para impedir la pérdida de compuestos volátiles y la adquisición de olores extraños.
- 4) Mantener la integridad estructural y proteger contra el daño físico causado por impacto mecánico, presión, vibraciones y otros factores.
- 5) Actuar como vehículo de ingredientes funcionales, tales como agentes antimicrobianos y antioxidantes, nutraceuticos e ingredientes de color y sabor (Rooney, 2005).
- 6) Evitar o reducir el deterioro microbiano durante el almacenamiento prolongado (Kader, 1989).

## Introducción

---



**Figura 5.** Propiedades funcionales de los recubrimientos biodegradables aplicados a frutas y verduras frescas (adaptado de *Lin y col., 2007*)

Como se mencionó anteriormente, los principales deterioros de calidad en los productos frescos están íntimamente relacionados con los fenómenos de transferencia de masa, incluyendo la adsorción de humedad, la permeación al O<sub>2</sub>, la pérdida de sabor, la absorción de olores indeseable y la migración de los componentes del envase al producto (Debeaufort y col. 1998; Miller y col., 1998; Krochta, 2002).

Para el desarrollo de recubrimientos comestibles destinados a productos frescos y mínimamente procesados, se deben tener en cuenta importantes atributos de calidad (Zhao y col., 2005) que se mencionan a continuación:

## Introducción

---

1. Apariencia: es el atributo más importante de la calidad de los productos frescos y mínimamente procesados, siendo la principal preocupación la uniformidad del color, el brillo y ausencia de defectos en la piel (Aked, 2000), marchitamiento, manchas y arrugas de la piel causadas por el envejecimiento natural o el crecimiento de microorganismos (Kader, 1985).
2. Textura: frecuentemente la textura de frutas y verduras es interpretada en términos de firmeza, fresca y jugosidad.
3. Flavor y otros atributos sensoriales: el flavor implica la percepción de muchos componentes del sabor y aroma (Kader, 2002). Los componentes del sabor comunes en los productos frescos son el dulzor, acidez, astringencia y amargor. El nivel de azúcar y ácido, así como el perfil de aromas, se modifican durante la maduración y almacenamiento postcosecha de varias frutas y verduras, determinando el momento adecuado para su comercialización.
4. Calidad nutricional: las frutas y verduras frescas son una fuente importante de nutrientes, incluyendo vitaminas (B6, C, tiamina, niacina), minerales, fibras dietéticas y cantidades significativas de sustancias fitoquímicas que desempeñan importantes papeles en la salud humana. Las pérdidas postcosecha en la calidad nutricional, sobre todo el contenido de vitamina C y algunos fitoquímicos, pueden ser sustanciales.

## Introducción

---

5. Seguridad: los factores de seguridad incluyen sustancias tóxicas naturales, contaminantes tales como residuos químicos, metales pesados y contaminación microbiana. Los productos frescos son altamente susceptibles al deterioro de hongos.

La correcta selección de los ingredientes y aditivos a utilizar para formular un recubrimiento biodegradable, permite obtener un film que pueda prevenir el desarrollo de sabores y aromas indeseables durante el almacenamiento postcosecha, controlar la deshidratación y decoloración, retrasar el blanqueamiento, mejorar el brillo de la superficie y mejorar la integridad mecánica del producto. Sin embargo, procedimientos adecuados de saneamiento y manejo pueden ayudar a reducir el riesgo potencial de contaminación (Lin y col., 2007).

Es posible adicionar ingredientes tales como plastificantes y emulsificantes para mejorar la funcionalidad de los recubrimientos (Valencia-Chamorro y col., 2011). En la mayoría de los casos se requiere del uso de plastificantes, especialmente para los recubrimientos a base de polisacáridos y proteínas ya que presentan una estructura quebradiza y rígida (Krochta, 2002). El glicerol, monoglicérido acetilado, polietilenglicol y sorbitol son los plastificantes más comunes incorporados para mejorar las propiedades mecánicas (Guilbert y col., 1995), siendo la función principal mejorar la flexibilidad y capacidad de procesamiento de los polímeros (Vieira, 2011).

## Introducción

---

Sin embargo, la adición de plastificantes afecta la resistencia de los recubrimientos a la transferencia de gaseosa (Sothornvit y col., 2000, 2001). De hecho, el uso de plastificantes en formulaciones de películas a base de Ch también ha sido estudiado. Suyatma y col., (2005) encontraron que el glicerol y polietilenglicol son los más adecuados como plastificantes para Ch que etilenglicol y propilenglicol, teniendo en cuenta su eficiencia de uso.

Los emulsionantes son agentes tensioactivos de carácter anfifílico, capaces de reducir la tensión superficial de lípido-agua o la interface agua-aire. Los emulsionantes son esenciales para la formación de revestimientos a base de proteínas o polisacáridos que contienen lípidos. La adición de un emulsionante en recubrimientos a base de proteína de suero aumenta la hidrofiliidad y capacidad de recubrimiento de superficies de maní, mejorando así la barrera frente al O<sub>2</sub> (Lin y col., 2005). Los tensioactivos se incorporan a la formulación de los films para mejorar su humectabilidad y su adhesión. Además, se espera una disminución de los valores de permeabilidad al vapor de agua debido a la incorporación de componentes con carácter hidrófobo (Ziani y col., 2008).

### **I.3.1. Envases activos**

Una de las principales ventajas del uso de películas y recubrimientos biodegradables es que varios ingredientes activos (tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutraceuticos, prebióticos, vitaminas) se

## Introducción

---

pueden incorporar en la matriz polimérica, mejorando así la seguridad e incluso los atributos nutricionales y sensoriales del alimento (Rojas-Grau y col., 2009).

El envase activo es un concepto innovador que se puede definir como un modo de envasado en el que el envase, el producto y el ambiente interactúan para prolongar la vida útil o mejorar las propiedades sensoriales y de seguridad, mientras se mantiene la calidad del producto (Siddiqui y col., 2011). Los envases activos cambian la condición de los alimentos envasados con la incorporación de ciertos aditivos en las películas o en el espacio de cabeza de manera de extender la vida útil del producto (Bhat, 2013).

Los recubrimientos activos, la nueva generación en envases para alimentos, están cobrando cada vez más interés en los investigadores y la industria debido a su potencial para proporcionar beneficios en la calidad y seguridad en los alimentos. Las investigaciones recientes en este tipo de envases se han focalizado en el uso de preservativos naturales en materiales de envasado biodegradables (Siripatrawan y col., 2012).

Los envases activos incluyen componentes del sistema de envasado que son capaces de eliminar el O<sub>2</sub>, absorber CO<sub>2</sub>, etileno, humedad y/o sabores u olores indeseables; liberar CO<sub>2</sub>, antioxidantes, etanol y/u otros conservantes; y/o mantener el control o compensar los cambios de temperatura (Day, 1994).

Teniendo en cuenta que la vida útil de los alimentos envasados depende de factores intrínsecos (como pH, contenido de nutrientes, actividad



## Introducción

---

de agua, tasa de respiración, etc.) y de factores extrínsecos (como temperatura y HR de almacenamiento, composición gaseosa que lo rodea, etc.), es necesario evaluar las tecnologías de envasado existentes y las que están en desarrollo, como los envases activos, y aplicarlas para mantener la calidad y extender la vida útil de los diferentes productos alimenticios (Day, 2001). Los envases activos no sólo proporcionan una barrera inerte frente a las condiciones externas, sino que desempeñan un papel importante en la preservación de los alimentos (Rooney, 2005).

Las técnicas de envasado activo se pueden dividir en dos categorías. La primera categoría son los absorbentes o secuestrantes, donde los sistemas eliminan los compuestos no deseados tales como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etileno y exceso de humedad. La segunda categoría son los sistemas de liberación o emisores, los cuales añaden activamente o liberan compuestos, en pequeñas cantidades, al alimento o en el espacio de cabeza, tales como CO<sub>2</sub>, agentes antioxidantes, antimicrobianos y conservantes (Bhat, 2013).

La incorporación de antimicrobianos y/o sustancias antioxidantes en los materiales de envasado ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a que el deterioro microbiano y la oxidación son los principales problemas que afectan la calidad de los alimentos (Siripatrawan y col., 2012). De esta manera, se puede reducir la adición de grandes cantidades de aditivos alimentarios que por lo general se incorporan en los alimentos. Debido al riesgo potencial para la salud causados por compuestos activos sintéticos (Gómez-Estaca y col., 2009), la investigación se ha conducido a emplear

## Introducción

---

compuestos activos naturales como alternativa a los antioxidantes sintéticos, incluyendo la incorporación de  $\alpha$ -tocoferol películas de gelatina de pescado (Jongjareonrak, 2008), tetrahidrocurcuminoides, flavonoides y extracto de té verde en películas de Ch (Portes, 2009; Torres y col., 2012; Siripatrawan y col., 2010) y extracto antioxidante de borraja en películas de gelatina (Gómez-Estaca y col., 2009).

Frutas y verduras recién cortadas son más perecederas que sus correspondientes productos enteros sin cortar debido a las heridas que sufren durante la preparación. La barrera física y química proporcionada por la epidermis, que impide el desarrollo de los microorganismos en la superficie de la fruta, es eliminada durante el procesamiento (Brecht, 1995). Sin embargo, son necesarios más estudios para entender las interacciones entre los componentes activos y los materiales de recubrimiento cuando se desarrollan nuevas películas y recubrimientos comestibles, antes de su aplicación sobre la superficie de un sistema alimentario real (Rojas-Grau y col., 2009).

La concentración de compuestos activos a adicionar a los recubrimientos debe ser calculada adecuadamente ya que es importante conocer los efectos de su funcionalidad, como ser sus propiedades barrera y mecánicas. Algunos estudios han reportado el efecto de la adición de compuestos activos en la funcionalidad de películas comestibles. Por ejemplo, Mei y Zhao (2003) evaluó la viabilidad de películas comestibles a base de proteínas de leche como transporte de altas concentraciones de calcio

## Introducción

---

(5% o 10% p/v) y vitamina E (0,1% o 0,2% p/v); sin embargo, la funcionalidad de la película se vio comprometida. Por el contrario, Park y Zhao (2004) reportaron que las propiedades barrera al vapor de agua de las películas a base de Ch fueron mejoradas con el aumento de la concentración de mineral (5 y 20% p/v de lactato de zinc) o vitamina E en la matriz polimérica; sin embargo, algunas propiedades mecánicas se vieron afectadas. Varios investigadores han tratado de incorporar minerales, vitaminas y ácidos grasos en formulaciones de recubrimiento comestibles para mejorar el valor nutricional de algunas frutas y verduras, donde estos micronutrientes están presentes en bajas cantidades. Tapia y col. (2008) reportaron que la adición de ácido ascórbico (1% p/v) en recubrimientos comestibles a base de alginato y gellan ayudó a preservar el contenido de ácido ascórbico natural de papaya recién cortada, ayudando así a mantener su calidad nutricional durante el almacenamiento.

En los últimos años, se ha prestado atención a la adición de probióticos para obtener películas y recubrimientos comestibles funcionales (Galvano y col., 2015). Tapia y col. (2007) han desarrollado las primeras películas comestibles como recubrimientos probióticos en manzana y papaya recién cortadas, observando que ambas frutas se recubrieron con éxito conteniendo bifidobacterias viables.

Las operaciones de procesamiento de frutas y verduras frescas cortadas pueden inducir cambios indeseables en el color y apariencia de estos productos durante el almacenamiento y la comercialización (Rojas-Grau y

## Introducción

---

col., 2009). Este fenómeno es causado generalmente por la enzima polifenol oxidasa (PPO), que en presencia de O<sub>2</sub>, convierte los compuestos fenólicos en pigmentos de color oscuro (Zawistowski y col., 1991). La aplicación de tratamientos antioxidantes tales como inmersión después de pelar y/o cortar es la forma más común de control del pardeamiento de vegetales frescos cortados. La incorporación de agentes que este defecto en recubrimientos comestibles aplicados a frutas recién cortadas, ha sido estudiada por varios autores. Los ácidos carboxílicos (ácido cítrico y ácido oxálico) también se han sugerido como agentes antioxidantes efectivos en frutas recién cortadas (Rojas-Grau y col., 2009). Por ejemplo, la adición de ácido cítrico y ascórbico en recubrimientos a base de metilcelulosa con la finalidad de controlar la permeabilidad al O<sub>2</sub> y reducir las pérdidas de vitamina C en damascos durante el almacenamiento ha sido reportada por Ayranci y Tunc (2004). El efecto de recubrimientos en combinación con agentes antipardeamiento (1% Ch; 2% ácido ascórbico y 0,5% CaCl<sub>2</sub>) sobre rodajas de manzanas mínimamente procesadas durante el almacenamiento ha sido estudiado por Haiping y col. (2011).

Los productos mínimamente procesados, como se mencionó anteriormente, durante el proceso sufren transformaciones que pueden resultar en una pérdida dramática de firmeza de los tejidos debido a la acción de enzimas pécticas. En los cortes superficiales se pueden iniciar reacciones que normalmente no se producen debido al contacto entre los sustratos y las enzimas (Toivonen y col., 2008). Potenciadores de textura también pueden

## Introducción

---

añadirse a los recubrimientos biodegradables para minimizar el ablandamiento durante el almacenamiento de frutas y vegetales recién cortadas.

La forma más común de controlar los fenómenos de ablandamiento en vegetales MP es el uso de tratamientos con sales de calcio (García y col., 1996). Hernández-Muñoz y col. (2008) observaron que la adición de gluconato de calcio a la formulación de recubrimientos a base de Ch aumentó la firmeza de frutillas durante el almacenamiento refrigerado. Han y col. (2004) observaron que recubrimientos a base de Ch conteniendo 5% de calcio aumentó la firmeza de frambuesas congeladas en aproximadamente un 25% en comparación con las muestras control sin recubrir.

### **I.4. Quitina y quitosano**

En los últimos tiempos, está siendo cada vez mayor la toma de conciencia sobre la conveniencia de utilizar biopolímeros naturales para diversas aplicaciones en la vida diaria (Tharanathan, 2003). Los polisacáridos, una clase de macromoléculas naturales, son bioactivos y generalmente se derivan de materias primas agrícolas (como celulosa, almidón, pectina) o de desechos de crustáceo y de pared celular de microorganismos, como ser quitina y quitosano (Ch) (Ramesh y col., 2003; Aranaz y col., 2009). Estos últimos son recursos renovables que en la actualidad se están estudiando intensamente por sus aplicaciones en la

## Introducción

---

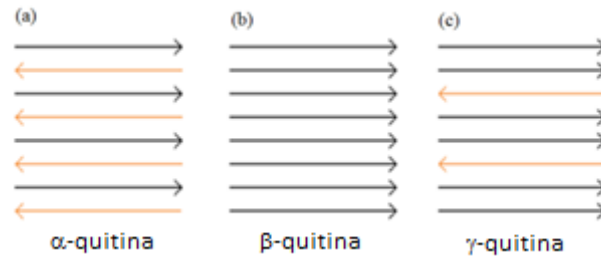
industria farmacéutica, cosmética, biomédica, biotecnológica, agrícola, alimenticia e inclusive en industrias no alimenticias, como tratamiento de agua, papel e industria textil (Gupta y col., 2000). El Ch es uno de los polímeros más interesantes para estas diversas áreas de interés gracias a una combinación inusual de actividades biológicas, y propiedades mecánicas y físicas (Mourya y col., 2008).

La quitina es el segundo biopolímero natural más abundante (después de la celulosa) derivado de exoesqueletos de los crustáceos y también de la pared celular hongos e insectos (Peter, 2005). El científico francés Henry Braconnot fue el primero que aisló quitina de hongos en 1811 (Muzzarelli y col., 2012) y fue producida comercialmente por primera vez en Japón, en 1971 (García, 2008).

La quitina se presenta en tres formas polimórficas de estado sólido designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  -quitina que difieren en su grado de hidratación, tamaño de la celda unidad y el número de cadenas de quitina por unidad de celda (Carlstrom, 1957). En la  $\alpha$ -quitina las cadenas están dispuestas en una estructura cristalina firmemente compactada de hojas antiparalelas y extensos enlaces de hidrógeno intermolecular. La  $\beta$ -quitina resulta ser más móvil y presenta hojas dispuestas de forma paralela; mientras que, la  $\gamma$ -quitina es una combinación de ambas, presentando dos cadenas “hacia arriba” cada una cadena “hacia abajo” (Figura 6).

## Introducción

---



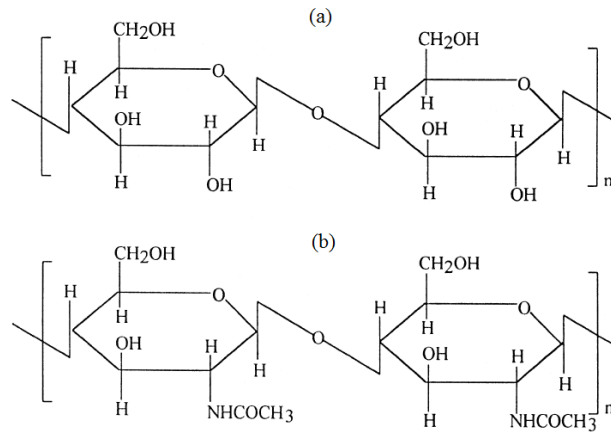
**Figura 6.** Diagrama presentando las 3 estructura polimórficas de la quitina: (a)  $\alpha$ - quitina (b)  $\beta$ -quitina (c)  $\alpha$ - quitina (adaptado de *Ahmed y Ikram, 2015*)

La  $\alpha$ -quitina es más abundante ya que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos y en la pared celular de los hongos. La  $\beta$ -quitina se encuentra principalmente en las plumas de calamar, mientras que la  $\gamma$ -quitina puede encontrarse en el estómago de calamares y sepias (Gooday, 1990; Rudrapatnam y col., 2002).

La quitina es un heteropolímero catiónico lineal de unidades N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y D-glucosamina (GLuN) unidas con enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4), donde las unidades de N-acetil-D-glucosamina son las que predominan en la cadena polimérica (Arbia y col., 2013), siendo su estructura similar a la celulosa. (Figura 7).

## Introducción

---



**Figura 7.** Estructura química de (a) celulosa y (b) quitina (adaptado de *Gupta y Ravi Kumar, 2000*)

La mayor fuente de quitina industrial proviene de desechos de la producción de alimentos marinos, principalmente conchas de crustáceos, como por ejemplo, camarones o cangrejos (Chang y col., 1997; Xu, Gallert y col., 2008). En el procesamiento de camarones para el consumo humano, entre el 40 y 50% de la masa total son residuos. Alrededor del 40% de los residuos es quitina con incrustaciones de carbonato de calcio, y también pueden contener lípidos de los residuos musculares y carotenoides, principalmente astaxantina y sus ésteres. Según la especie y las variaciones estacionales, los residuos de los crustáceos presentan de un 30 a 40% de proteínas, 30 a 50% de carbonato de calcio y 20 a 30% de quitina (Cho y col., 1998; Kurita, 2006; Jo y col., 2011). La quitina es un producto ligero en



## Introducción

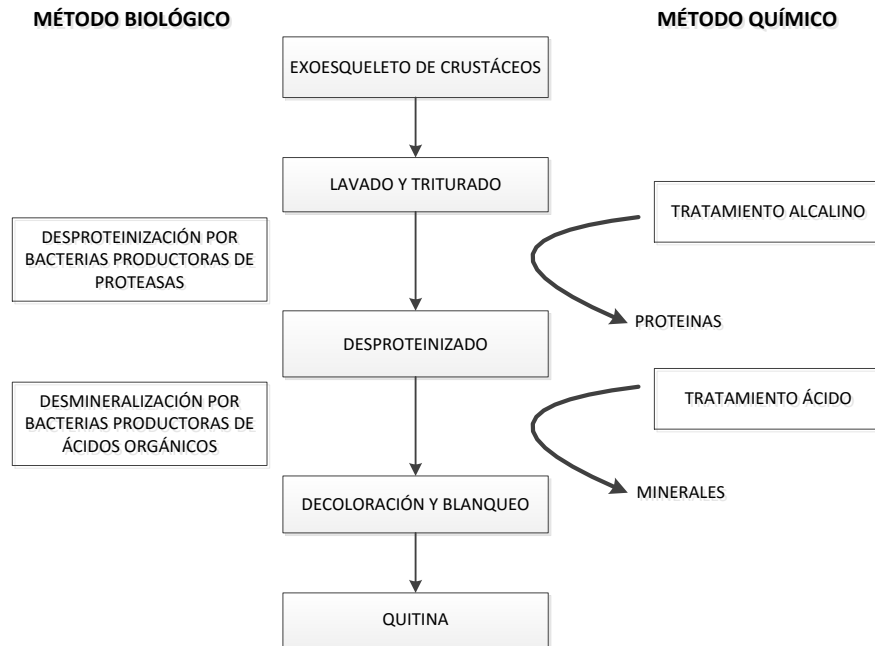
---

polvo o copos, de color blanco a amarillento, no tóxico y biodegradable que puede ser procesado en múltiples derivados. Además, es completamente insoluble en agua o en medio ácido (García, 2008).

### **I.4.1. Extracción de quitina**

El método tradicional para la obtención comercial de la quitina de la concha de los crustáceos (exoesqueleto) consiste en dos etapas básicas (Figura 8): (1) separación de proteínas, o desproteínización, por tratamiento alcalino (Percot y col., 2003), y (2) separación de carbonato de calcio, o desmineralización, por tratamiento ácido (HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a alta temperatura, seguido de una etapa de blanqueo con reactivos químicos para obtener un producto incoloro (Choorit y col., 2008).

## Introducción



**Figura 8.** Obtención de quitina por el método químico y biológico (adaptado de *Arbia y col., 2013*)

Tratamientos con ácidos fuertes o altas concentraciones de NaOH pueden causar efectos indeseables en el producto final como hidrólisis del polímero, desacetilación y despolimerización indeseables, modificación en las propiedades físicas, etc. que pueden afectar su peso molecular (promedio y polidispersidad) y grado de acetilación, y de manera indirecta, la calidad final de la quitina (Kjartansson y col., 2006; Jung y col., 2007).

Debido a que el método químico de obtención de la quitina presenta un alto perjuicio para el medio ambiente asociado a las cantidades de ácidos

## Introducción

---

y bases minerales involucradas, y al problema de la disposición de los desechos (Wang y col., 1998; Healy y col., 2003) se presenta como alternativa el uso de métodos biológicos (García, 2008). El uso de proteasas para separar las proteínas evitaría el tratamiento con álcali (Figura 8).

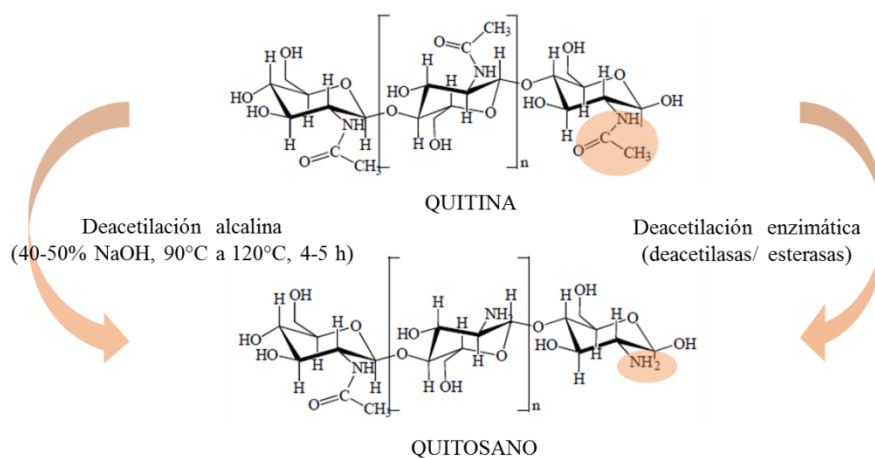
Numerosos estudios e investigaciones se han realizado respecto de diferentes métodos biológicos y posibles optimizaciones, como por ejemplo: uso de ácido láctico producido por bacterias para la fermentación de los residuos de camarón (Rao y col., 2000; Bautista y col., 2001; Cira y col., 2002; Adour y col., 2008), uso de bacterias no lácticas (Oh y col., 2000; Sini y col., 2007; Jo y col., 2008; Sorokulova y col., 2009) o cofermentación de diversas bacterias para obtención de la quitina (Jung y col., 2006; Waldeck y col., 2006; Aytakin y col., 2010).

### **I.4.2. Obtención de quitosano**

El Ch es un biopolímero natural derivado de la quitina, producido por un proceso de N-deacetilación, resultando en un grupo amino en la posición C-2 (Luo y col., 2013). El proceso de desacetilación de la quitina es generalmente producido por métodos químicos en soluciones alcalinas concentradas a elevadas temperaturas (Ravi Kumar, 2000). Esto es llevado a cabo normalmente por tratamiento de hidrólisis severa debido a la resistencia de los grupos acetamida impuesta por la disposición *trans* de los

## Introducción

sustituyentes C2-C3 en el anillo glucosídico (Aranaz y col., 2009). Un esquema del proceso de obtención del Ch se representa en la Figura 9.



**Figura 9.** Obtención de Ch a partir de quitina (método químico y enzimático) (adaptado de *Ahmed y col., 2015*)

Por otra parte, el Ch puede ser obtenido por desacetilación enzimática de la quitina usando quitina desacetilasas o acetil xilano esterasas (Aye y col., 2006). Sin embargo, el método enzimático tiene un uso limitado en la producción industrial de Ch, debido al mayor costo de las enzimas (Venkatesan y col., 2014).

Químicamente el Ch consiste de la unión glucosídica de residuos de GlcNAc y GLuN estando estos últimos en una proporción mayor al 40% (Muzzarelli y col., 1986) (Figura 9). El proceso de desacetilación conduce a

## Introducción

---

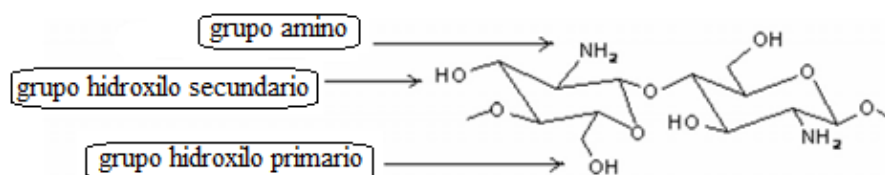
la producción de un Ch que presenta una distribución aleatoria de unidades acetiladas / desacetiladas a lo largo de la cadena polimérica. El Ch es el nombre designado para la serie de polímeros con diferentes proporciones de unidades glucosamina y monómeros de N-acetil glucosamina. La mayoría de los quitosanos comerciales tienen menos de 30% de unidades acetiladas y un peso molecular (PM) entre 100 y 1.500 kDa (Zivanovic y col., 2015).

Las propiedades del Ch son fuertemente afectadas por las condiciones bajo las cuales éste es procesado, ya que son las condiciones de procesamiento las que controlan la cantidad de desacetilación que ocurre. El grado de desacetilación (GDA) determina la cantidad de grupos aminos libres en la cadena polimérica; estos grupos aminos libres le dan al Ch su carga positiva, cuando el mismo se encuentra en solución ácida y se produce la protonación de los mismos ( $\text{NH}_3^+$ ) (Lee y col., 2009). El GDA y el grado de polimerización (GP), determinantes del PM del polímero, son dos importantes parámetros que indicarán el uso del Ch para diversas aplicaciones (Mourya y col., 2008). El GDA puede variar del 40% al 98% (Hejazi y col., 2003). Es importante resaltar que el pKa del Ch (otorgado por los grupos  $\text{NH}_2$ ) tiene un valor cercano a la neutralidad (~6.3) (Yi y col., 2005). A  $\text{pH} < 6,3$ , los grupos aminos libres están protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) y el Ch resulta en un polielectrolito catiónico soluble en agua. A  $\text{pH} > 6,3$ , los grupos aminos libres se desprotonan, el Ch pierde su carga y se vuelve insoluble. Como consecuencia, presenta una pobre solubilidad en disolventes orgánicos y una completa insolubilidad en soluciones acuosas por encima de  $\text{pH}=7$ ,

## Introducción

---

debido a su alta cristalinidad y capacidad para formar enlaces hidrógeno entre las macromoléculas de Ch (Kurita y col., 2000). Reducir el PM y su cristalinidad a través de desacetilación aleatoria mejora su solubilidad en ácidos diluidos por debajo de pH=5, donde los grupos aminos libres están protonados (Thanou y col., 2005). Actualmente, numerosas investigaciones se están desarrollando en todo el mundo respecto del proceso de obtención de quitina y Ch a fin de lograr y adaptar las funcionalidades requeridas para maximizar las utilidades de este biopolímero (Dutta y col., 2004). El Ch es una molécula flexible que puede ser modificada químicamente ya que proporciona tres grupos funcionales reactivos (figura 10) que permiten alterar las propiedades físico-mecánicas y aumentar las aplicaciones a diferentes campos. Estos tres grupos reactivos son: grupo hidroxilo primario (C-6) y secundario (C-3) en cada unidad de repetición y el grupo amino (C-2) en cada unidad desacetilada (Mourya y col., 2008). Los grupos amino, junto con los grupos hidroxilos, le dan al Ch su funcionalidad, lo que le permite ser un polisacárido altamente reactivo (Lee y col., 2009).



**Figura 10.** Grupos funcionales reactivos del Ch (adaptado de Mourya y Inamdar, 2008)

## Introducción

---

### I.4.2.1. Caracterización

Las características que presente el Ch tienen gran influencia en sus propiedades y, por ende, sobre sus posibles aplicaciones. Ha sido reportado que el GDA (Li y col., 1992) y el PM (Rabea y col., 2003) son las dos características químicas más importantes que pueden influir en el comportamiento de este biopolímero en varias de sus aplicaciones (Baxter y col., 1992). El GDA determina la solubilidad y la reactividad; influyendo sobre las características electrostáticas ácido-base, la biodegradabilidad y la habilidad para quelar iones metálicos (Balázs y col., 2007). El PM influye en las propiedades físico-químicas y biológicas (Lago y col., 2011). Varios métodos han sido reportados para la determinación de estas características (Aranaz y col., 2009).

Como se mencionó anteriormente, uno de los parámetros más importante para caracterizar al Ch, es el GDA. Un alto %GDA, por lo general, significa una buena solubilidad en ácidos, gran capacidad de reacción y gran habilidad para quelar iones de metales pesados. Esto se debe a que los grupos amino primarios del Ch están activos y fácilmente disponibles para diversas modificaciones químicas (Wang y col., 2004).

Los métodos más comúnmente empleados para la determinación del %GDA son la titulación potenciométrica y espectroscopia infrarroja (IR) (Lago y col., 2011). Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y

## Introducción

---

desventajas; y es reconocido que utilizar una única técnica no puede cubrir todo el rango de GDA (Brugnerotto y col., 2001).

En la titulación potenciométrica el Ch se disuelve en un ácido para ser titulado con una base, determinándose el %GDA a través del volumen consumido en la reacción, aplicando diferentes ecuaciones. A pesar de que esta técnica tiene limitaciones relacionadas con la solubilidad y la correcta correlación de modelos matemáticos para obtener resultados certeros, es una de las técnicas más simples y de bajo costo que ha sido utilizada por la industria durante muchos años (Balázs y col., 2007).

La espectroscopía IR es una técnica ampliamente utilizada debido a su simplicidad y rapidez, además, es un método no destructivo para las muestras a analizar ya que no es necesario disolver la muestra en soluciones acuosas (Berghoff, 2011). Sin embargo, se detectan otros problemas como la ampliación de un pico y la superposición de dos o más picos, la elección de las líneas de base, así como la calibración (Van de Velde y col., 2004) que pueden conducir a resultados incorrectos. Además, el análisis de la muestra podría verse afectada por el procedimiento empleado para la preparación del quitosano, las condiciones experimentales e incluso el equipo utilizado (Fernández Cervera y col., 2004). Varios procedimientos para determinar el %GDA en muestras de quitina y Ch utilizando espectroscopía IR fueron recopilados por Kasaai (2008).

Es ampliamente conocido que la viscosimetría capilar es la técnica más comúnmente utilizada para determinar el PM de polímeros (Wang y col.,



## Introducción

---

2004). La viscosidad es un parámetro crucial para la calidad del Ch (Van Toan, 2009), estando estrechamente relacionada con el %GDA (Kucukgulmez y col., 2011). Este método tiene la desventaja de no ser una técnica absoluta, por lo que requiere la determinación de constantes mediante la correlación de valores de viscosidad intrínseca con valores de pesos moleculares medidos por un método absoluto (Berghoff, 2011). Sin embargo, a pesar de que la cromatografía de permeación en gel (GPC), cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de filtración en gel (GFC) son técnicas más versátiles y útiles para la determinación del PM de polímeros, se requieren equipos muy costosos (Fung, 2007).

La determinación del PM del Ch por SEC ha sido extensamente estudiada, siendo reportada la primera caracterización mediante esta técnica en 1971 por Wu y col. Es un método usado por numerosos investigadores, con diferentes combinaciones de columnas, fases móviles y concentraciones de Ch (Ottoy y col., 1996; Kubota y col., 2000; Sorlier y col., 2001; Lamarque y col., 2005; Fernandez-Megia y col., 2005; Yanagisawa y col., 2006). La técnica SEC requiere una calibración que relaciona el tiempo de elución a través de estándares de reducida polidispersidad de PM conocido. Desafortunadamente, este tipo de calibración sólo proporciona pesos moleculares relativos a los estándares, de modo que la precisión depende de la suposición de un comportamiento de disolución del estándar elegido similar al del Ch (Beri y col., 1993), como por ejemplo, uso de dextrano o

## Introducción

---

pululano (Chen y col., 2003; Chen y col., 2005) Debido a que las muestras de Ch son muy heterogéneas y presentan un amplio rango de PM, la selección de una columna apropiada es un paso crucial para lograr resultados satisfactorios (Nguyen y col., 2009).

### **I.4.2.2. Propiedades biológicas**

Debido a las excelentes propiedades que presenta el Ch, fuente natural renovable, el desarrollo de materiales a base de este biopolímero ha recibido especial atención no sólo en el área biomédica, sino también en el campo de materiales de envasado que están en contacto con alimentos (Dutta y col., 2009). El Ch presenta propiedades únicas como ser: biocompatibilidad, biofuncionalidad, biodegradabilidad, propiedades antibacterianas y antifúngicas y antioxidantes, y alta capacidad formadora de películas (Shahidi y col., 1999; Sabnis y col., 2000; Muzzarelli y col., 2005; Xia y col., 2010; Aider, 2010). En la ciencia de los alimentos, el Ch tiene un particular interés respecto de los polímeros sintéticos porque es considerado como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Luo y col., 2013). En los últimos años, en numerosos trabajos de investigación se han desarrollado sistemas de envasado antimicrobianos para mejorar la calidad y seguridad de los alimentos (Lago y col., 2011).

## Introducción

---

### I.4.2.3. Propiedades antimicrobianas

En las dos últimas décadas se ha incrementado el número de investigaciones respecto de la posibilidad de utilizar al Ch como un antimicrobiano natural. La actividad antimicrobiana de éste ha sido considerada como una de las propiedades más importantes, que corresponden directamente a sus aplicaciones biológicas (Wei y col., 2003; Xia, 2003; Zhao y col., 2006). Allan y Hadwiger (1979) fueron lo que informaron por primera vez que el Ch tenía efecto antifúngico de amplio espectro. El Ch se ha aplicado para extender la vida útil de diferentes categorías de productos alimenticios (Hafdani y col., 2011). Martín-Diana y col. (2009) incorporaron Ch en jugo de naranja sin pasteurizar y evaluaron sus parámetros nutricionales y de calidad. Coma, Deschamps y Martial-Gros. (2003) sugirieron la aplicación de Ch como preservador en productos lácteos.

La actividad antimicrobiana varía considerablemente con el tipo de biopolímero (%DGA y PM), el tipo de microorganismo y las condiciones del medio en el cual es aplicado; especialmente pH, fuerza iónica y presencia de solutos susceptibles de reacción con Ch (Aider, 2010). Se ha demostrado que Ch de PM menor a 10 kDa tiene mayor actividad antimicrobiana que Ch de alto PM (Uchida y col, 1989). Liu y col. (2006) evaluaron las propiedades antibacterianas de soluciones de diferentes concentraciones de quitosanos con diversos PM (55 a 155 kDa), pero con igual GDA ( $80\% \pm 0,29$ ), frente a *E. coli*. De acuerdo con sus resultados, todas las muestras presentaron

## Introducción

---

actividad antibacteriana a concentraciones mayores de 200 ppm, siendo mayor para el Ch de bajo PM. No y col. (2002) también evaluaron la actividad antibacteriana de seis muestras de Ch de diferente PM frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, presentando inhibición del crecimiento de la mayoría de los microorganismos evaluados dependiendo del PM del polímero y la especie bacteriana.

Diversos investigadores han centrado sus trabajos en el modo de acción antibacteriano del Ch y sus derivados. Los dos principales mecanismos sugeridos son: (1) la unión de Ch catiónico a los fosfolípidos, y en consecuencia la restricción del movimiento de sustancias microbiológicas, y (2) la penetración del Ch dentro de las células de los microorganismos y la inhibición del crecimiento de la célula por el bloqueo en la replicación del ARN (Sashiwa y col., 2004). Chung y col. (2004) demostraron la relación entre la actividad antibacteriana del Ch y las características superficiales de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se ha aceptado de manera general que el Ch es más eficaz como agente antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas que Gram-negativas. Sin embargo, resultados contradictorios respecto de la correlación entre el PM y la actividad antimicrobiana han sido reportados por Zivanovic, Davis y Golden (2015). Un alto %GDA aumenta la solubilidad y densidad de carga del Ch; estos dos factores son importantes para la adhesión del Ch con la pared celular. Bajos valores de pH (hasta 5,5) incrementan la actividad antimicrobiana debido a su mayor solubilidad y protonación en el intervalo

## Introducción

---

de pH ácido (Aider, 2010). Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana del Ch aumenta al disminuir el pH. No y col. (2002), reportaron que el Ch con diferentes solventes orgánicos ácidos exhibió efectos inhibitorios variados sobre bacterias. En general, el ácido acético, láctico y fórmico son los más efectivos para inhibir el crecimiento bacteriano que los ácidos ascórbico y propiónico. Este efecto puede considerarse como sinérgico al estrés ácido producido sobre las células bacterianas (Rhoades y col., 2000).

### **I.4.2.4. Capacidad formadora de film**

Diversos estudios han demostrado que los films a base de Ch tienen un alto potencial para incrementar la vida útil de frutas frescas y vegetales, inhibiendo el crecimiento de microorganismos, reduciendo la producción de etileno, incrementando el gas carbónico interno y disminuyendo los niveles de O<sub>2</sub> (Aranaz, 2009). Aplicaciones de películas y recubrimientos a base de Ch sobre diferentes alimentos han sido reportadas por numerosos investigadores en las últimas décadas. Recubrimientos a base de Ch han demostrado ser efectivos en el retraso de la maduración y la disminución de las tasas de respiración de frutas y verduras (Krochta y col., 1997; Vargas y col., 2006). Estos recubrimientos son semipermeables y pueden crear una atmósfera modificada similar a la atmósfera controlada utilizada en el almacenamiento, pero a un costo más bajo (Aranaz y col., 2009). Zhang y Quantick (1998) y Park y col. (2005) demostraron el efecto antifúngico de

## Introducción

---

recubrimientos de Ch en frutillas y frambuesas frescas durante el almacenamiento en frío, mostrando además, la excelente compatibilidad del Ch con otros agentes antifúngicos. Agulló y col. (1998) evaluaron la capacidad de películas de Ch para extender la vida de pizzas precocidas. Srinivasa y col. (2002) investigaron el efecto del envasado en atmósfera modificada usando películas de Ch, sobre la calidad del mango, y mostraron una extensión de la vida útil de hasta 18 días sin crecimiento microbiano ni pérdida de sabor. Recubrimientos a base de Ch prolongaron el tiempo de almacenamiento y controlaron la podredumbre de manzanas (Du y col., 1998), duraznos (Li y col., 2000) y uvas (Romanazzi y col., 2002). Durango y col. (2006) evaluaron el efecto antimicrobiano de un recubrimiento a base de Ch y almidón sobre zanahorias mínimamente procesadas, encontrando buenas propiedades inhibitorias sobre coliformes y bacterias ácido-lácticas.

### **I.4.2.5. Propiedades antioxidantes**

El Ch también presenta capacidad antioxidante que ha sido previamente documentada. La actividad secuestrante de radicales libres que presenta el Ch se ha atribuido a la presencia de los grupos nitrogenados protonados sobre el C-2, que tienen la capacidad de unirse simultáneamente con varios radicales libres (Park y col., 2004). Algunos autores han demostrado que el PM del Ch es también un factor importante en su capacidad antioxidante (Youn y col., 2001). Kim y Thomas (2007) mostraron

## Introducción

---

que la velocidad de oxidación de lípidos en el salmón se redujo cuando se adicionaron Ch de diferentes PM, siendo el de menor PM (30 kDa) el que mostró la mayor actividad antioxidante a bajas concentraciones, entre 0,2% p/v y 0,5% p/v. Xie, Xu y Liu (2001) estudiaron la actividad antioxidante de derivados de Ch solubles en agua los cuales fueron considerados como secuestrantes del radical  $\bullet\text{OH}$ . Xue y col., (1998) informaron que los quitosanos solubles en agua pueden quelar metales o combinarse con los lípidos resultando en un efecto antioxidante significativo.

La capacidad antioxidante del Ch también está influenciada por su viscosidad. Kamil, Jeon, y Shahidi (2002) reportaron que el Ch con una viscosidad de 14 cp fue más eficaz que el de mayor viscosidad en la prevención de la oxidación de lípidos en carne de arenque. Darmadji y Izumimoto (1994) observaron la efectividad del tratamiento con Ch sobre la inhibición de la oxidación lipídica de carne vacuna. St. Angelo y Vercellotti (1989) también informó que el N-carboximetil quitosano fue efectivo controlando el sabor a sobre cocido y en la reducción del hexanal observado en la carne molida. Liu (2008) estudió la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del Ch; los resultados mostraron que la adición de 0,02% p/v de Ch presentó efectos antioxidantes en manteca de cerdo y aceite de colza crudo.

### **I.4.2.5.1. Quitosano como envase bioactivo antioxidante**

## Introducción

---

En la actualidad, la seguridad alimentaria es un gran problema en todo el mundo y se ha incrementado el desarrollo de materiales con capacidad de formación de película, junto con propiedades antioxidantes que ayudan a mejorar la seguridad alimentaria y la vida útil de los alimentos (Wan y col., 2013). La incorporación de antioxidantes en los materiales de envasado es cada vez más común ya que la oxidación es el mayor problema que afecta la calidad de los alimentos. Actualmente los antioxidantes más comúnmente utilizados en los materiales de envasado son el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT). A pesar de que los antioxidantes sintéticos son muy efectivos por su alta estabilidad y eficiencia, y su bajo costo, hay diferentes cuestiones respecto de los aspectos toxicológicos y el potencial riesgo para la salud (Siripatrawan y col., 2010).

Numerosas investigaciones se han desarrollado con el fin de emplear antioxidantes naturales como alternativa a los antioxidantes sintéticos para proteger a los alimentos contra la rancidez oxidativa, la degradación y descoloración. El Ch ha sido considerado como una materia prima potencial para las películas o recubrimientos comestibles, haciéndolo interesante para su uso como un material de envasado activo biodegradable (Hromis y col., 2014). Además, los recubrimientos a base de Ch pueden llevar altas concentraciones de vitaminas y minerales logrando un aumento del contenido de estos nutrientes en frutas frescas y congeladas sin alterar su funcionalidad antifúngica y de barrera a la humedad (Han y col., 2004a, 2004b). Pasanphan y Chirachanchai (2008) informaron que al incorporar ácido gálico se



## Introducción

---

introdujeron grupos fenólicos hidroxilos adicionales sobre el Ch mostrando un efecto sinérgico respecto de la solubilidad en agua y la capacidad antioxidante (Pasanphan y col., 2010). Schreiber y col, 2013 también encontraron que el aducto ácido gálico-Ch presentaba efecto antioxidante logrando reducir altos niveles de sustancias reactivas.

Recubrimientos a base de Ch conteniendo acetato de  $\alpha$ -tocoferol retrasó significativamente el cambio de color en frutillas frescas y congelados (Han y col., 2004b).

Películas activas a base de Ch y alcohol polivinílico (PVA) conteniendo extracto acuoso de menta y extracto de piel de granada, fueron evaluadas por Kanatt y col. (2012), resultando en un efecto potenciador sobre la capacidad antioxidante por determinación de actividad antiradicalaria frente a 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Siripatrawan y Harte (2010) incorporaron extracto de té verde, en concentraciones de 2 a 20% p/v, a películas a base de Ch, logrando aumentar el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante con el aumento de la concentración del extracto. También, la incorporación de compuestos fenólicos como carvacrol (López-Mata y col., 2013) y tetrahidrocurcuminoides (Portes y col., 2009) en películas a base de Ch demostraron presentar una mayor actividad antioxidante y un mayor efecto protector frente a DPPH.

Los aceites esenciales de plantas pueden ser tenidos en cuenta como una alternativa natural a los conservantes químicos (Burt, 2004). Hromis y col. (2014) evaluaron la actividad antioxidante de películas a base de Ch con

## Introducción

---

el agregado de aceites esenciales de comino y orégano, resultando en un incremento en la capacidad antiradicalaria de ambos films. Gómez-Estaca (2009) demostraron que la incorporación de aceite de borraja en películas biodegradables a base de gelatina, dio lugar a un marcado aumento de sus propiedades antioxidantes, con mínimas modificaciones de sus propiedades físico-químicas. La capacidad antioxidante de las películas con aceite de borraja fue incluso superior a la de las películas con  $\alpha$ -tocoferol y BHT.

Aceite esencial de romero, en concentraciones de 0,5 a 1,5% v/v, fue incorporado en films a base de Ch mejorando el efecto antioxidante debido a la presencia de un mayor contenido fenólico (Abdollahi y col., 2012). Mehdizadeh y col. (2012) y Shaaban y Mahmoud (2014) estudiaron el efecto antioxidante frente a DPPH de películas compuestas de almidón y Ch con aceite esencial de tomillo, logrando un aumento significativo del contenido de fenoles y su capacidad antiradicalaria.

### **I.4.2.6. Otras propiedades biológicas de interés**

El Ch, además, presenta otras propiedades biológicas de gran interés, como ser hipocolesterolémico, efectos inmunológicos, antitumorales, anticancerígenos, antiinflamatorios, transportador de drogas, acelerador de absorción de hierro y calcio, entre otros. Estudios sobre estas propiedades

## Introducción

---

están en continuo aumento en las últimas décadas (Cunha y col., 2012; Xia y col., 2010; Gupta y col., 2000).

La actividad inmunoestimulante del Ch ha sido reportada por varias décadas. Nishimura y col. (1984) concluyeron que Ch con 70%GDA era un regulador inmune que podía activar los macrófagos y células naturales asesinas, aumentar la citotoxicidad e inducir la mitosis en las células produciendo interleucinas e interferón. Más tarde, Suzuki y col. (1986) informaron sobre la mejora en la regulación inmune con el aumento de la solubilidad en agua del Ch. El Ch también mostró una mejora en el sistema inmune debido a una mejor respuesta de los anticuerpos. El efecto del Ch se estudió como adyuvante para una vacuna antigripal inactivada (Chang y col., 2004) aumentando notablemente el contenido de anticuerpos y la defensa antiviral en ratones. La capacidad del Ch y sus derivados para modular la respuesta inmune parece estar relacionada con la presencia de N-acetil-D-glucosamina y su capacidad para activar diferentes receptores de la superficie de la membrana y las vías de las células inmunes (Porporatto y col., 2003; Feng y col., 2004).

El Ch también se conoce por su capacidad como portador de fármacos, el cual puede mejorar la absorción de éste y mejorar su liberación. Por ejemplo, también podría utilizarse como un portador de medicamentos para proporcionar quimioterapia anticancerígena y antitumoral (Xia y col., 2010). Aunque el Ch y sus derivados se han utilizado principalmente como vehículos de fármacos para el tratamiento contra el cáncer (Dass y col.,

## Introducción

---

2008), resultados experimentales *in vitro* e *in vivo* indican que el Ch de bajo PM y quitoooligosacáridos, pero no Ch de alto PM, pueden presentar actividad antitumoral intrínseca, provocando efectos estimulantes al sistema inmune (Suzuki y col., 1986; Qin y col., 2002).

La capacidad del Ch y sus derivados para aumentar la absorción de cationes, es ampliamente conocida. El Ch puede acelerar la absorción de calcio y hierro, y la quelación de iones metálicos, relacionado con su característica de transporte de drogas (Liao y col., 2007; Park y col., 2010). Derivados del Ch han sido evaluados para superar la solubilidad limitada del Ch mejorando la absorción a valores de pH neutros tales como los que se encuentran en el tracto intestinal, para evitar daños en la membrana celular o alterar la viabilidad de las células epiteliales intestinales (Thanou y col., 2001).

El Ch presenta efectos anti-inflamatorios y regenerativos del tejido artrítico; tiene grupos amino libres que pueden neutralizar los ácidos gástricos y formar una membrana protectora en el estómago, por lo que podría ser utilizado para curar la indigestión ácida y úlcera péptica (Xia y col., 2010). Además, resulta ser eficaz para prevenir y curar la artritis reumatoide, y ser usado como fármaco antiartrítico, no presentando efectos secundarios o toxicidad al ser consumido por un largo período (Olivier y col., 2007).

La actividad antiinflamatoria de quitoooligosacáridos ha sido investigada tanto *in vitro* como *in vivo*. Yang y col., 2010 estudiaron el efecto

## Introducción

---

de quitooligosacáridos con diferente PM (10-20 kDa y 1-3 kDa) sobre varios mediadores de respuesta inmuno-inflamatorios producidos por los macrófagos, presentando ambos, un fuerte efecto inhibitorio.

Las propiedades hipocolesterolémicas del Ch se han evidenciado de manera creciente indicando que el Ch puede reducir plasma y triacilglicerol hepático, así como los niveles de colesterol total exhibiendo hipocolesterolemia (Cho y col., 1998; Ikeda y col., 1993). Se ha informado que el Ch puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares disminuyendo los niveles de lípidos en plasma sin efectos secundarios (Maezaki y col., 1996) y tener una potente capacidad *in vitro* de unión a las grasas (Zhou y col., 2006). Sin embargo, los mecanismos de la acción hipocolesterolémica e hipolipidémica de diferentes quitosanos continúan siendo poco claros.

Adicionalmente, el Ch y sus oligosacáridos presentan otras funciones biológicas tales como, exclusión de toxinas de los intestinos, reducción de intoxicación por metales pesados en los seres humanos, prevención de caries y enfermedades dentales (Xia, 2003), como factor bifido para regular el metabolismo microbiano en intestinos (Lee y col., 2002), efectos anti-mutagénicos (Nam y col., 2001), etc.

### **I.4.3. Funcionalización del quitosano**

## Introducción

---

A pesar de las grandes ventajas que presenta el Ch, sus principales limitaciones para diversas aplicaciones es su alta viscosidad, su baja solubilidad a pH neutro (Aranaz y col., 2009), capacidad antioxidante limitada y su alta hidrofiliidad y fragilidad (Kanatt y col., 2008; Holmes y col., 2011). La funcionalización enzimática o química ha sido propuesta como un método para superar estos inconvenientes. Además, numerosos investigadores están desarrollando diferentes métodos para mejorar sus propiedades físico-químicas, biológicas y antioxidantes a través de la incorporación de moléculas activas en el esqueleto polisacárido (Aljawish y col., 2015).

La funcionalización química resulta de gran interés ya que se pueden obtener derivados de polisacáridos con propiedades modificadas según aplicaciones específicas en diversas áreas, principalmente farmacéutica, biomédica y biotecnológica. (Aljawish y col., 2015). Debido a la reactividad de los grupos aminos del Ch, gran variedad de reacciones químicas se han empleado para modificar la molécula (Kumar y col., 1999). La funcionalización química se basa en la inserción de pequeños grupos funcionales en la red polimérica del Ch, tales como alquilos o compuestos fenólicos para mejorar sus propiedades, incluyendo la solubilidad a pH neutro y alcalino sin afectar su carácter catiónico, antimicrobiano y antioxidante (Liu y col., 2013; Aytakin y col., 2011; Curcio, 2009). Sin embargo, el uso de reactivos químicos necesarios para este tipo de funcionalización puede causar efectos adversos, no sólo para el medio

## Introducción

---

ambiente, sino también sobre el cuerpo humano cuando los polímeros derivados se aplican a productos alimenticios o en el campo de la medicina. Además, se pueden producir reacciones secundarias con productos no deseados (Lin y col., 2005). Debido a las crecientes preocupaciones ambientales y de seguridad alimentaria, las enzimas fueron investigadas como una alternativa atractiva frente al uso de reactivos químicos (y sus peligros asociados) poco amigables con el medio ambiente y no específicos (Couto y col., 2005). Las enzimas catalizan reacciones biológicas con alta selectividad sin ningún cambio permanente en su estructura (Silavi y col., 2012). La especificidad que presenta una enzima permite, de manera más precisa, modificar la estructura molecular y mejorar las funciones del polímero modificado (Kumar y col., 1999).

Uno de los procesos que ha sido estudiado para modificar enzimáticamente a un polímero consiste en emplear una enzima para generar un reactivo intermediario que luego reaccione con el polímero. Debido a que el sustrato polimérico no necesita unirse en el sitio activo de la enzima, no se producen limitaciones estéricas. Dordick y col. (Popp y col., 1991; Blinkovsky y col., 1993) han estudiado este proceso utilizando peroxidasas (POD) a fin de lograr unir fenoles en polímeros de lignina. De una manera análoga, Jarvie, Overton y Pourcain (1998) utilizaron la enzima lipasa con  $H_2O_2$  para generar ácido peroxicarboxílico para que luego reaccione con polibutadieno para generar grupos epóxidos en el polímero.

## Introducción

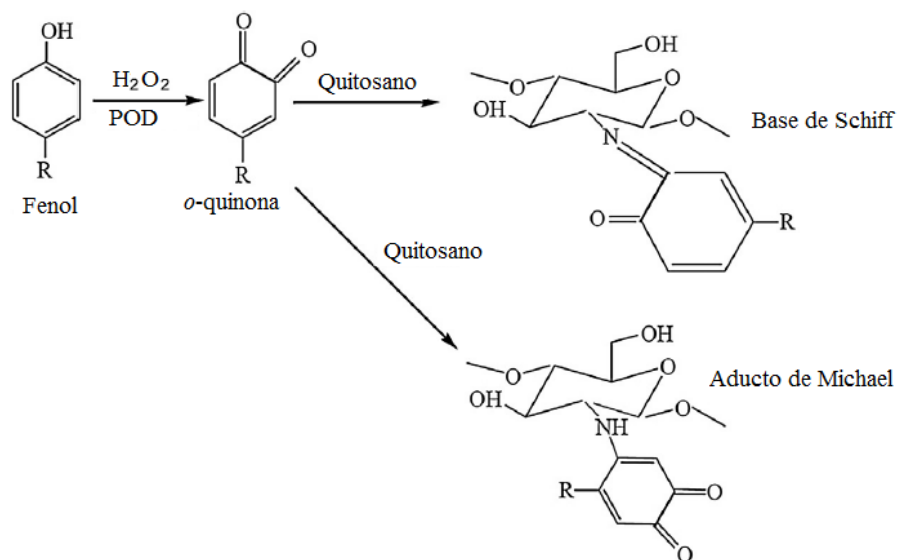
---

Los grupos reactivos que presenta el Ch pueden ser modificados permitiendo su funcionalización con gran variedad de moléculas bioactivas o el uso de reactivos de reticulación para la mezcla con otros biopolímeros. De hecho, en el proceso de funcionalización enzimática del Ch se utilizan esencialmente enzimas oxidativas tales como polifenol oxidasas (PPO) (tirosinasas, lacasas) y POD. Estas enzimas generan intermediarios reactivos que pueden difundir fuera del sitio activo de la enzima hacia el medio de reacción y sufrir reacciones no catalizadas químicamente, logrando minimizar los subproductos no deseados (Yi y col., 2005).

Los productos intermedios activados son especies reactivas y electrofílicas que pueden, ya sea condensarse entre sí para formar dímeros, trímeros y sustancias poliméricas, o reaccionar químicamente con el sustrato inicial para producir nuevos radicales libres, o bien reaccionar no enzimáticamente con grupos nucleofílicos por enlaces covalentes tales como los grupos aminos libres del Ch a  $\text{pH} < 6,3$  (Bozic y col., 2012; Aljawish y col., 2012). Aunque el mecanismo de la etapa de reacción no enzimática aún es poco conocido, la evidencia experimental parece apoyar la hipótesis de que los productos intermedios pueden sufrir (al menos) dos tipos de reacciones diferentes con los grupos amino desprotonados del Ch para producir ya sea bases de Schiff ( $\text{C}=\text{N}$ ) o aductos de tipo Michael ( $\text{C}-\text{NH}$ ) por enlaces covalentes con el sustrato fenólico (Figura 11) (Kumar y col., 1999).



## Introducción



**Figura 11.** Mecanismo de reacción de oxidación de compuestos fenólicos por POD en presencia de Ch (adaptado de *Aljawish y col., 2015*)

Es posible que las quinonas intermedias se sometan a uno o ambos tipos de reacciones con las aminas, así como formar oligómeros reaccionando con otras quinonas y producir una mezcla compleja de productos (Davies y Frahn, 1977).

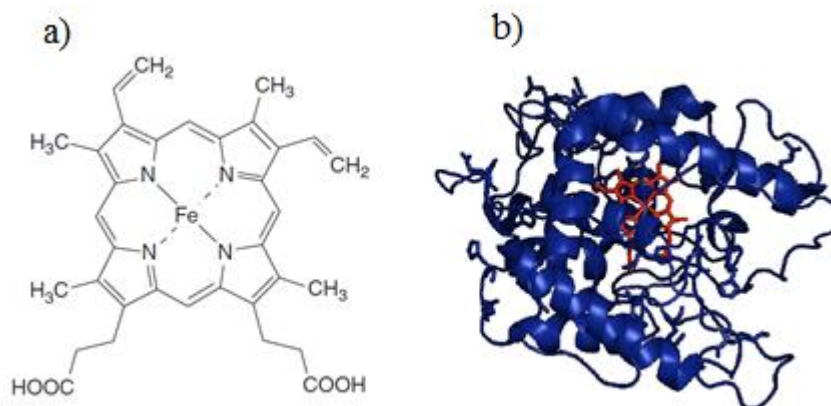
En este trabajo de tesis se utilizó una POD, específicamente la enzima cloroperoxidasa (CPO, EC 1.11.1.10) del hongo *Caldariomyces fumago*, como elemento biológico para llevar a cabo la funcionalización del Ch, a través de la oxidación del flavonoide quercetina (Q).

## Introducción

---

Las enzimas oxidativas como las POD han sido reportadas como potenciales catalizadores regio- y estereo- selectivos para la polimerización de sustratos fenólicos, así como para formar aductos entre los productos intermedios oxidados con la macromolécula de Ch (Fras-Zemljic y col., 2011; Muzzarelli, 1994; Sousa y col., 2009).

La mayoría de las POD son hemoproteínas que tienen un grupo prostético hemo unido a la cadena polipeptídica; el grupo hemo es un complejo de protoporfirina de hierro IX (figura 12).



**Figura 12.** a) Esquema molecular de la protoporfirina de hierro IX, grupo hemo de las POD. b) Diagrama de cinta de CPO con el grupo hemo en color rojo. (Terán y col., 2013)

Este tipo de enzimas está presente en plantas, microorganismos y animales (Francesco y col., 2011). Las POD catalizan la oxidación de compuestos

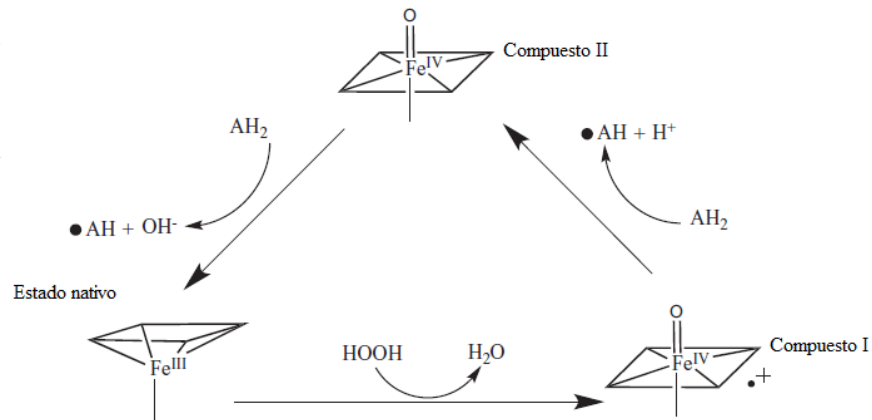
## Introducción

---

fenólicos a sus correspondientes quinonas en presencia de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como agente oxidante (Duran y col., 2000). Estas enzimas están siendo utilizadas como una nueva herramienta para la funcionalización de polímeros industriales, tales como el Ch. En este caso las POD presentan varias ventajas como ser, actúan sobre un amplio rango de sustratos y el pH óptimo para su actividad es entre 5 y 6 siendo esto conveniente en las modificaciones del Ch ya que solubiliza a pH <6.0 (Zavaleta-Avejar, 2014).

El mecanismo de reacción de la POD se puede describir en términos generales según la figura 13. La acción catalítica se inicia con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que reacciona con el grupo hemo de la enzima para producir el Compuesto I (catión-radical- $\pi$  porfirínico con  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ). Durante esta etapa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es reducido a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), mientras que la enzima se oxida. El Compuesto I entonces oxida el sustrato reducido ( $\text{AH}_2$ ) para dar un sustrato radical ( $\text{AH}\bullet$ ) y se reduce al Compuesto II, que contiene un centro de oxiferril coordinado a una porfirina. Por lo general, ambos Compuestos, I y II, reaccionan con el mismo  $\text{AH}_2$ . Por lo tanto, una vez que la reacción entre los compuestos I y  $\text{AH}_2$  comienza, el Compuesto II es producido y, simultáneamente, reacciona con una segunda molécula de  $\text{AH}_2$ . Como resultado, el Compuesto II es reducido nuevamente al estado férrico, que corresponde a la forma nativa de la enzima, con la oxidación simultánea de una segunda molécula del sustrato y producción de  $\text{H}_2\text{O}$  (Terán y col., 2013).

## Introducción



**Figura 13.** Ciclo catalítico de la enzima POD. (adaptado de *Terán y col., 2013*)

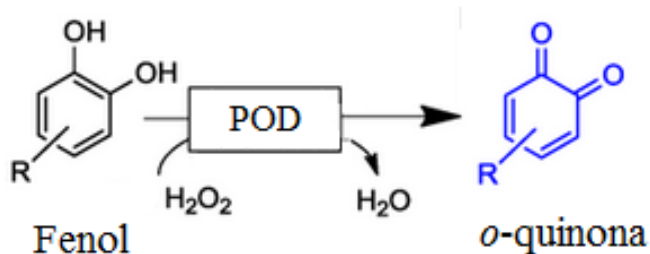
La CPO (figura 12) fue aislada por primera vez hace más de 30 años desde el hongo *Caldariomyces fumago* (Morris y col., 1966). La estereoquímica del sitio activo de la CPO y los modelos moleculares fueron publicados en 1998 por Sundaramoorthy, Turner y Poulos. Tiene un peso molecular de aproximadamente 42.000 Da y contiene alrededor de un 25% de carbohidratos (Thomas y col., 1970). Es la más versátil de las proteínas del tipo hemo-tiolato y se caracteriza por ser una glicoenzima muy estable a 40°C y pH entre 3,0 y 5,5 (La Rotta y col., 2005). El principal problema asociado con aplicaciones sintéticas y biotecnológica de la CPO es la disminución de su actividad en presencia de un exceso de los sustratos, incluyendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo general, la velocidad de reacción enzimática

## Introducción

---

aumenta primero con el aumento de la concentración de  $H_2O_2$  y luego decae después de alcanzar el máximo (Shevelkova y col., 1996).

A partir de su aislamiento, los usos potenciales de la CPO se han extendido a diversos campos como el diagnóstico analítico, los productos farmacéuticos y control de la contaminación (Pickard y col., 1991). Esta hemo peroxidasa ha sido sujeto de numerosas investigaciones (Wagenknecht y col., 1997), destacando la capacidad de catalizar la oxidación de diversos compuestos fenólicos (Pickard y col., 1991; Casella y col., 1994; Zhao y col., 1996), donde los mismos pueden ser oxidados a sus correspondientes quinonas por POD, como se muestra en la figura 14. Estas quinonas son especies altamente reactivas que se someten luego a reacciones no enzimáticas (Pourcel y col., 2007).



**Figura 14.** Oxidación enzimática catalizada por POD sobre compuestos fenólicos (adaptado de *Hollmann y col., 2012*)

Como ya se mencionó, mediante la formación de bases de Schiff o aducto de Michael se produce el acoplamiento de la quinona de los flavonoides a los polímeros que contienen grupos  $NH_2$ , como ser el Ch

## Introducción

---

(Brzonova y col., 2011; Jayakumar y col., 2005). Por ejemplo, las POD generan quinonas reactivas a partir de fenoles que pueden reaccionar con el Ch (Vachoud y col., 2001; Pasanphan y col., 2010). Este proceso de acoplamiento entre el producto oxidado de los flavonoides y los polímeros está siendo cada vez más estudiado en especial con el objetivo de lograr diferentes aplicaciones en la industria textil y alimentaria (Kudanga y col., 2011).

Además, han sido reportados estudios sobre diferentes tipos de reacciones que pueden ser catalizadas por esta enzima, como ser epoxidación, sulfoxidación, oxidación de compuestos aromáticos, heteroátomos, derivados de naftilos y de aminas, halogenación, entre otras (Terán y col., 2013).

Ya en 1979, Corbett y Chipko, demostraron la capacidad catalítica de la CPO, en reacciones de oxidación de arilaminas, empleando como agente oxidante el  $H_2O_2$ . Sanfilippo y Nicolosi (2002) han estudiado las reacciones de transferencia de  $O_2$  en dienos conjugados cíclicos, evaluando los efectos de la estereoquímica y reactividad de la enzima en diferentes reacciones.

La capacidad de biotransformación de monoterpenos R(+)-limoneno,  $\alpha$ -pineno y  $\gamma$ -terpineno por medio de la enzima CPO del hongo *Caldariomyces fumago* en medios orgánicos fue reportada por Arias, Stashenko y Torres (2007).

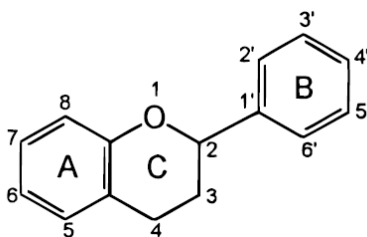
Torres y col. (2012) evaluaron la capacidad oxidativa de la CPO sobre diversos flavonoides, incluido la Q, produciendo compuestos intermediarios que reaccionaron con el Ch.

## Introducción

---

### I.5. Quercetina

Los flavonoides, una clase de polifenoles naturales, son compuestos presentes en una gran variedad de plantas, frutas y verduras que son consumidos diariamente (Peterson y col., 1998). Hasta el momento, más de 4000 flavonoides diferentes se han aislado de plantas, en éstas se forman a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, y malonato (Harborne, 1986). La estructura básica es un núcleo flavano que consta de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (C6-C3-C6), que se mencionan como A, B, y C (figura 15). Las variaciones en el anillo C y los diversos patrones de sustitución disponibles para los anillos A y B permiten una variedad de estructuras flavonoides (Hollman y col., 1997).



**Figura 15.** Estructura básica de un flavonoide (*Pietta, 2000*)

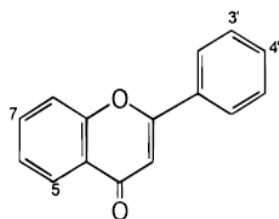
La estructura básica de un flavonoide permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus

## Introducción

---

características estructurales se pueden clasificar en: flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, etc. (Flórez y col., 2002). En la figura 16 se representan aquellas estructuras que revisten mayor interés.

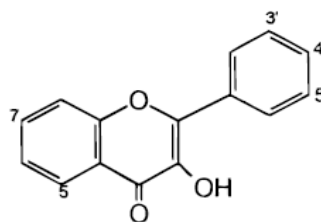
(a)



Flavonas

	5	7	3'	4'
luteolina	OH	OH	OH	OH
apigenina	OH	OH		OH
crisina	OH	OH		

(b)



Flavonoles

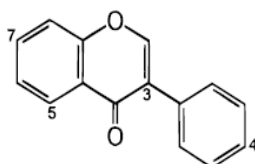
	5	7	3'	4'
quercetina	OH	OH	OH	OH
kaemferol	OH	OH		OH
galangina	OH	OH		
fisetina		OH	OH	OH



## Introducción

---

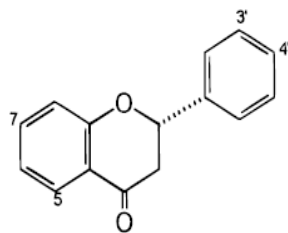
(c)



Isoflavonas

	5	7	4'
genisteína	OH	OH	OH
genistina	OH	Oglc	OH
daidzeína		OH	OH
biochanin A	OH	OH	OCH <sub>3</sub>

(d)



Flavanonas

	5	7	3'	4'
hesperetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
naringenina	OH	OH		OH

**Figura 16.** Estructura de varias clases de flavonoides. (a) Flavonas; (b) Flavonoles; (c) Isoflavonas; (d) Flavanonas (adaptado de *Pietta, 2000*).

Los flavonoides presentan funciones centrales en diversos aspectos de la vida de la planta relacionada con la interacción con el medio ambiente (Lepiniec y col., 2006; Winkel-Shirley, 2006; Treutter, 2006). Por ejemplo,

## Introducción

---

protegen la planta contra radiaciones ultravioleta, también presentan propiedades antimicrobianas y actúan como un elemento de disuasión para los herbívoros limitando la asimilación de las proteínas alimentarias e inhibiendo las enzimas digestivas (Scalbert, 1991; Dixon y col., 2005). Los flavonoides actúan como catalizadores en la fase luminosa de la fotosíntesis y / o como reguladores de los canales de hierro implicados en la fosforilación (Pietta y col., 1999). Además, debido a su favorable propiedad para absorber los rayos UV, los flavonoides protegen a las plantas de la radiación UV del sol (Shirley, 1996).

Los flavonoides también juegan un papel importante en la salud humana mediante su consumo a través de frutas y verduras, previniendo enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (Pourcel y col., 2007). Numerosas publicaciones recientes han demostrado que el estudio sobre la biodisponibilidad de los flavonoides es un campo de la investigación que todavía está en pleno desarrollo. Su actividad bioquímica y fisiológica son hoy en día reconocidas e intensamente estudiadas (Fiorucci y col., 2007). En los últimos treinta años, numerosos estudios han demostrado la actividad biológica de estos compuestos, incluyendo la inhibición de la proliferación de células cancerígenas y de enzimas, y actividad antiviral y antibacteriana (Antonczak y col., 2009).

Los flavonoides representan una clase de metabolitos secundarios naturales que han encontrado numerosas aplicaciones relacionadas con la salud humana. Esta clase de compuestos resultan interesantes especialmente

## Introducción

---

por su actividad antioxidante y secuestrante de radicales (Hollmann y col., 2012). Hay un creciente interés por los antioxidantes naturales presentes en las plantas desde el punto de vista de la seguridad. Los polifenoles han recibido un creciente interés por parte de los consumidores y fabricantes en las últimas décadas por los numerosos beneficios que presentan para la salud, como ser su capacidad antibacteriana, antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, antiviral, anticarcinogénica, etc. (He y col., 2012).

Los sustituyentes de sus anillos funcionalizados son los responsables de su potencial como compuesto antirradicalario, antioxidante, así como prooxidantes. De hecho, los flavonoides están implicados en la captura directa de las especies reactivas de  $O_2$  (EROS), en la inhibición de las enzimas responsables de la producción de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Antonczak y col., 2009), en la quelación de los iones metálicos de transición involucrados en los procesos de formación de radicales y en la prevención del proceso peroxidación mediante la reducción de los radicales alcoxilos y peroxilos (Cotelle, 2001; Nagao y col., 1999).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Havsteen, 1983; Peres, 1994). La capacidad antioxidante de los flavonoides depende del número y posición de los grupos hidroxilos que contienen y el pH del medio en que se encuentren. De este modo, una mayor capacidad antioxidante será manifiesta en aquellos

## Introducción

---

flavonoides con un mayor número de grupos hidroxilos (Oliveira y col., 2003; Dugas y col., 2000). Los flavonoides retiran  $O_2$  reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células (Martínez-Flórez y col., 2002).

Entre la familia flavonoles, una subclase de flavonoides, la Q (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol) ha sido considerada como el más representativo de los flavonoles y numerosos estudios se han centrado en su reactividad y su amplia bioactividad (Antonczak y col., 2009), tales como propiedades antiproliferativas y anticancerígenas (Dajas, 2012), antifibróticas (Horton y col., 2013), anticoagulantes (Yu y col., 2013), antibacterianas (Hirai y col., 2010), antiaterogénicas (Pashevin y col., 2011), antihipertensivas (Perez-Vizcaino y col., 2006; Larson y col., 2012) y capacidades antiinflamatorias (Yoon y col., 2012; Bhaskar y col., 2013). La Q es uno de los antioxidantes más potentes entre los polifenoles (Formica y col., 1995; Rice-Evans y col., 1997; Prior, 2003), estando sus efectos antioxidantes estrechamente vinculados con la potencial generación de intermediarios reactivos pro-oxidantes que resultan mutágenos y genotóxicos (Boots y col., 2003).

La Q (figura 17) presenta tres grupos estructurales, determinantes para su quelación de radicales libres y/o potencial antioxidante: (i) un resto catecol (anillo B), (ii) una función carbonilo en el anillo C conjugado con dos

## Introducción

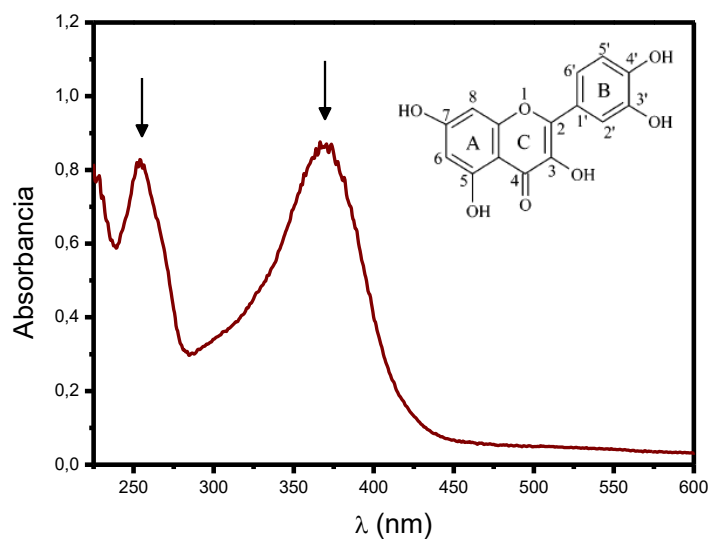
---

grupos hidroxilo en el C<sub>3</sub> (anillo C) y C<sub>5</sub> (anillo A), y (iii) un doble enlace entre C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Estos grupos hidroxilos pueden estar dehidrogenados, desprotonados u oxidados durante el curso de los mecanismos biológicos. Además, esta estructura altamente funcionalizada ofrece la posibilidad de que un catión metálico interactúe con el sustrato en los tres sitios acomplejantes (Fiorucci y col., 2007).

En la figura 17 se presenta además el espectro de absorción de la Q donde se observan las dos bandas características a 250 nm y 367 nm correspondientes a los anillos fenólicos A y B, respectivamente. Estas bandas disminuyen cuando se produce la oxidación del flavonoide a su respectiva quinona, al mismo tiempo que se incrementa la absorción entre 336 nm y 342 nm, típico de la formación de los productos de oxidación. Este comportamiento se ha observado cuando se produce la oxidación biológica de la Q por medio de POD y PPO (Manoj y col., 1999; Arias y col., 2007; Momic y col., 2009; Torres y col., 2012; Aljawish y col., 2015).

## Introducción

---



**Figura 17.** Estructura de la Q y espectro de absorción UV-Vis.

Las formas semiquinona y quinona, derivados de la Q por la sustracción de uno o dos  $H^\bullet$ , están involucrados en muchos procesos oxidativos. Por ejemplo, la Q reduce los radicales peroxilos involucrados en la peroxidación lipídica, y a través de esta reacción, se produce una semiquinona, que a continuación se somete a una desproporción para generar una quinona (Metodiewa y col., 1999; Gliszczynska-Swiglo y col., 2003). Los polímeros de Q catalizados por polifenol oxidasas han demostrado tener un efecto secuestrante más fuerte frente a EROS que sus respectivos monómeros en células humanas (Desentis-Mendoza y col., 2006). Uyama

## Introducción

---

(2007) y más tarde Kobayashi y Makino (2009) han investigado la síntesis, propiedades y aplicaciones de los polifenoles polimerizados, resultando la actividad antioxidante (y muy frecuentemente también otras propiedades relacionadas con la salud) significativamente mayor en comparación con los monómeros correspondientes.

La Q es uno de los flavonoides más abundantes en la dieta humana, que se encuentra en frutas y verduras (Manach y col., 2004; Moon y col., 2006). En las frutas y hortalizas, los flavonoles se presentan como glicósidos y está ausente la aglicona. Los datos disponibles respecto del contenido de Q de los productos alimenticios sugieren un promedio 15 mg/kg de peso fresco en frutas, teniendo las manzanas una concentración de 21 a 72 mg/kg; 0 a 100 mg/kg en hortalizas, 30 a 45 mg/kg en judías y 30 mg/kg en brócolis, presentando las cebollas un contenido especialmente alto (de 200-600 mg/kg); 4 a 16 mg/l en el vino tinto, 10 a 25 mg/l en el té y 2 a 23 mg/l en jugos de fruta (Prior, 2003). Sin embargo, el contenido de Q se ve afectado tanto por la manipulación del alimento antes de ser ingerido como por las condiciones de almacenamiento del mismo. D' Abrosca y col. (2007) comparó el contenido de flavonoides en la pulpa y la cáscara de manzanas, encontrándose una mayor concentración de flavonoides en la cáscara. Los alimentos que han sido fritos y cocidos muestran un menor contenido de Q. El calentamiento causa una mayor disminución del contenido de Q debido a la degradación térmica y la acción de lixiviación del agua hirviendo (Ahearn y col., 2002). Las cebollas pueden perder entre el 25 a 33% de su contenido

## Introducción

---

de Q en los primeros doce días de almacenamiento, pero sufren pérdidas mínimas luego de ese tiempo (Beecher, 2003). La forma de cultivo de los alimentos también tiene influencia sobre el contenido de Q. Por ejemplo, el contenido de flavonoles es mayor en las plantas expuestas a niveles más altos de rayos UV debido a su acción como posible mecanismo de defensa contra la luz UV (Ahearn y col., 2002).

En su estado natural, muchos flavonoides están unidos a azúcares, la forma *O*-glucósido, pudiéndose producirse la glicosilación en cualquier grupo OH para que se una un azúcar.

El derivado de la Q más común es la quercetina-3-*O*-glucósido que posee un azúcar (monosacárido como glucosa, galactosa, ramnosa o xilosa) en la posición 3. En la naturaleza son estas estructuras glicosiladas las más comunes, no la aglicona o compuesto original (Materska, 2008).

Si bien la molécula de Q tiene un carácter lipofílico, los derivados de la Q pueden ser tanto lipofílicos o hidrofílicos dependiendo del tipo de sustituyentes en la molécula. La glicosilación de al menos un grupo OH resulta en un aumento de su hidrofiliidad. Este cambio en el carácter lipofílico a hidrofílico es muy significativo para las plantas ya que los derivados glicosídicos son soluble en el citosol y pueden ser más fácilmente transportados a varias partes de la planta y almacenados en vacuolas (Rice-Evans y col., 1997; Williams y col., 2004).

Durante muchos años, numerosas investigaciones se han llevado a cabo estudiando las relaciones entre la estructura y la actividad antioxidante



## Introducción

---

de los compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos hasta la fecha han permitido determinar relaciones generales, es decir, se ha demostrado que la actividad antioxidante de un compuesto se determina por la presencia y ubicación de grupos OH libres (Rice-Evans y col., 1997; Wang y col., 2006). Además, los análisis realizados en diversos sistemas modelos han conducido a la determinación de que los grupos funcionales en las moléculas de los flavonoides son responsables de la actividad antioxidante (Wang y col., 2006). Ha sido demostrado que los derivados de Q presentan una menor actividad en comparación con aglicona libre (Cos y col., 1998; Burda y col., 2001; Materska y col., 2005). Esta actividad antioxidante más baja se debe principalmente al bloqueo de grupos OH por azúcar o sustituyentes alcoxilo. Además, el aumento de la hidrofiliidad de los glicósidos de Q modifica los coeficientes de distribución entre la fase acuosa y lipídica, que es de gran importancia en los sistemas de fases lipídicas utilizados para determinar la capacidad antioxidante como como TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox) o emulsión  $\beta$ -caroteno (Burda y col., 2001).

## Objetivos

---

### **II. OBJETIVOS**

## Objetivos

---

### II. OBJETIVOS

#### II.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis, fue estudiar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de películas bioactivas a base de quitosano para su empleo en la preservación de vegetales durante su almacenamiento.

#### II.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos se plantearon:

- Preparar películas activas a base de quitosano por la incorporación de compuestos bioactivos como flavonoides y carotenoides.
- Evaluar propiedades mecánicas y fisicoquímicas de las películas bioactivas. Específicamente determinar la resistencia a la tracción, la elongación de rotura, el espesor, densidad, transparencia, opacidad, contenido de humedad y solubilidad en agua.
- Determinar propiedades de barrera de las películas bioactivas. Evaluar la permeabilidad al vapor de agua, al oxígeno y al dióxido de carbono.

## Objetivos

---

- Estudiar las propiedades biológicas tales como capacidad antioxidante y antimicrobiana de las películas bioactivas.
- Evaluar el efecto del recubrimiento de vegetales con las películas bioactivas, durante su almacenamiento. Específicamente sobre las posibles alteraciones nutricionales y microbiológicas.

## Materiales y métodos

---

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## Materiales y métodos

---

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Reactivos

Para la formación de los films, se empleó Ch de bajo peso molecular, quercetina (Q) y enzima Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago*, obtenidos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA).

Los reactivos utilizados para la caracterización y derivatización del Ch, y para la obtención y caracterización de los films biodegradables se detallan a continuación:

- Tween 80 y glicerol, ambos de grado analítico, el reactivo de Folin-Ciocalteu y el cloruro férrico, grado ACS, fueron suministrados por Biopack (Argentina).
- El ácido L(+)-láctico, grado analítico, y el ácido clorhídrico, grado ACS, fueron obtenidos de Anedra (Argentina).
- El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), grado PA, el isopropanol y cloruro de potasio, ambos grado PA, el fosfato monobásico y dibásico de sodio, y bromuro de potasio, grado PA, el clorhidrato de hidroxilamina y el ácido ascórbico, ambos grado ACS, el hidróxido, cloruro y acetato de sodio, grado PA, fueron suministrados por Cicarelli (Argentina).
- El carbonato de sodio, grado PA, y ter butil alcohol (TBA) fueron obtenidos de Merck (Alemania)
- El ácido acético, grado PA, de Sintorgan (Argentina)

## Materiales y métodos

---

-El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido tricloroacético (TCA), de Fluka (Suiza)

-La 2-desoxirribosa, el nitroazul de tetrazolio (NBT), grado ACS, y Tritón-X 100 fueron provistos por Sigma-Aldrich (USA)

Para la determinación de la capacidad antioxidante de vegetales recubiertos, mediante técnica HPLC, se utilizaron los patrones  $\beta$ -caroteno (tipo II, sintético,  $\geq 95\%$  HPLC, cristalino) y ácido L-ascórbico (BioXtra,  $\geq 99,0\%$ , cristalino) provistos por Sigma-Aldrich (USA). Para la fase móvil fueron empleados solventes grado HPLC: metanol y acetonitrilo (de Sintorgan, Argentina). Para el proceso de extracción del ácido ascórbico (AA) y  $\beta$ -caroteno de la muestra de zanahoria se utilizó además, ácido meta-fosfórico (MPA) obtenido de Merck (Argentina), acetona, grado PA, éter de petróleo 40°-60° y sulfato de sodio anhidro, ambos grado ACS, obtenidos de Cicarelli (Argentina). Además, se utilizaron Diclorometano, grado HPLC, de Sintorgan (Argentina) y butil hidroxitolueno (BHT) también provisto por Cicarelli (Argentina) para el tratamiento previo de las muestras.

### III.2. Microorganismos y medios de cultivo

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se trabajó con cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Todos los medios de cultivo empleados que se presentan a continuación fueron obtenidos de Britania (Argentina).

## Materiales y métodos

---

- Medio líquido: Caldo nutritivo (CN)
- Medio específico de crecimiento: agar Manitol Salado (MS) para *S. aureus*, agar Hongos y Levaduras (HyL) para recuento de hongos y levaduras, caldo MacConkey para Coliformes totales, caldo Escherichia coli (EC) para *E. coli*.
- Medio para aislamiento: Agar de Recuento total (PCA),
- Solución diluyente: agua peptonada 0,1% p/v.

### III.2.1. Medios de cultivo

- Caldo nutritivo	(g/l)
Peptona de carne	5,0
Extracto de carne	3,0
pH FINAL: 6,9 ± 0,2	
- Agar Manitol Salado	(g/l)
Extracto de carne	1,0
Peptona de carne	5,0
Tripteína	5,0
Manitol	10,0
Cloruro de sodio	75,0
Rojo Fenol	0,025
Agar	15,0
pH FINAL: 7,4 ± 0,2	



## Materiales y métodos

---

- Agar Hongos y Levaduras	(g/l)
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Cloranfenicol	0,10
Agar-Agar	15,0
pH FINAL:	7,5 ± 0,2
- Caldo MacConkey	(g/l)
Peptona	20,0
Sales biliares	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Lactosa	10,0
Púrpura de Bromocresol (1,6 % en alcohol)	2,5
pH FINAL:	7,3 ± 0,2
- Caldo Escherichia coli	(g/l)
Trypteína	20,0
Lactosa	5,0
Sales biliares	1,9
Fosfato dipotásico	4,0
Fosfato monopotásico	1,5
Cloruro de sodio	5,0
pH FINAL:	6,9 ± 0,2

## Materiales y métodos

---

- Agar de Recuento total (Plate Count Agar) (g/l)

Peptona de caseína	5,0
Extracto de levadura	2,5
Glucosa	1,0
Agar – Agar	14,0

pH FINAL: 7,0 ± 0,2

### III.3. Metodología

#### III.3.1. Caracterización del Ch nativo

##### III.3.1.1. Grado de acetilación (% GDA)

###### III.3.1.1.1. Por titulación potenciométrica

Para la determinación del % GDA se empleó el método potenciométrico, según la metodología propuesta por Balázs y Sipos, 2007. Se pesaron 0,10 g de Ch y se disolvieron en un exceso conocido de HCl, se añadió NaCl para ajustar la fuerza iónica de la solución y fue agitado durante 5 horas hasta lograr la solubilización total del polímero. Una alícuota de 20 ml fue titulada potenciométricamente con NaOH 0,1N previamente valorado. La curva de dicha titulación presenta dos puntos de inflexión; el primero, corresponde a la neutralización del exceso de HCl y el segundo, la neutralización del Ch protonado (volumen necesario para

## Materiales y métodos

---

neutralizar el HCl que ha protonado los grupos amino del Ch). A través de la diferencia de ambos se obtiene el valor neto de NaOH requerido para calcular el número de grupos amino. Las ecuaciones 1 a 3 son las necesarias para el cálculo del % GDA. Las medidas se realizaron por triplicado. Para la determinación exacta de estos puntos se realiza la segunda derivada de la función que representa el cambio de pH según el agregado de NaOH.

$$x \frac{\text{mol}(-\text{NH}_2)}{\text{g Ch}} = \frac{(V_2 - V_1) N_{\text{NaOH}}}{m_{\text{Ch}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$y \frac{\text{mol}(-\text{NHCOCH}_3)}{\text{g Ch}} = (1 - x) \frac{\text{mol}(-\text{NH}_2)}{\text{g Ch}} \times 161 \frac{\text{g}}{\text{mol}(-\text{NH}_2)} / \frac{204 \text{ g}}{\text{mol}(-\text{NHCOCH}_3)} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\% \text{ GDA} = \frac{x \frac{\text{mol}(-\text{NH}_2)}{\text{g Ch}}}{y \frac{\text{mol}(-\text{NHCOCH}_3)}{\text{g Ch}} + x \frac{\text{mol}(-\text{NH}_2)}{\text{g Ch}}} \quad (\text{Ec. 3})$$

### III.3.1.1.2. Por espectroscopía IR

Ésta es la técnica más comúnmente empleada para caracterizar moléculas funcionalizadas de Ch ya que permite detectar modificaciones en la estructura molecular mediante el análisis detallado de las diferentes bandas del espectro (Rodríguez y col., 2010; García y col., 2012). El equipo utilizado fue un Nicolet Nexus equipado con un detector Mercurio Cadmio Telureto (MCT), con un promedio de 20 espectros, resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , perteneciente al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC)

## Materiales y métodos

---

dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). La muestra fue triturada en una relación 1:100 con bromuro de potasio (1 mg de Ch nativo: 100 mg de bromuro de potasio) y comprimida en discos. El %GDA fue calculado a partir de los espectros IR tomando como banda característica a la localizada a 1.380 cm, y como referencia la banda a 1.420 cm, obteniendo una correlación lineal que viene expresada por la ecuación 4.

$$\% \text{ GDA} = 31,92 \frac{A_{1.380}}{A_{1.420}} - 12,20 \quad (\text{Ec. 4})$$

### III.3.1.2. Determinación del peso molecular (PM)

#### III.3.1.2.1. Por viscosimetría

Para la determinación del PM del Ch nativo se empleó el método viscosimétrico, según la metodología propuesta por Knaul y col. (1998), con algunas modificaciones. Se realizaron diluciones seriadas de Ch (C) desde 0,5% p/v hasta 0,0625% p/v utilizando como disolvente buffer CH<sub>3</sub>COOH 0,25M / CH<sub>3</sub>COONa 0,25M. Se empleó un viscosímetro tipo Ubbelohde, con un diámetro de capilar de 1,5 mm, para medir el tiempo de caída del solvente puro (t<sub>0</sub>) y de las soluciones seriadas (t) entre los dos aforos del instrumento. El ensayo se realizó a una temperatura constante de 25°C. Los valores obtenidos se relacionan con la viscosidad por medio de coeficientes de

## Materiales y métodos

---

*viscosidad específica* ( $\eta_{sp}$ ) y *viscosidad reducida* ( $\eta_{red}$ ), definidas por las expresiones 5 y 6 respectivamente.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \approx \frac{t - t_0}{t_0} \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (\text{Ec. 6})$$

Para calcular la viscosidad intrínseca se representa gráficamente la viscosidad reducida frente a la concentración del polímero disuelto y se realiza la regresión lineal correspondiente. La viscosidad intrínseca es el valor de la ordenada al origen de dicha recta (Berghoff, 2011). Una vez calculada la viscosidad intrínseca, se puede determinar el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) de un polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) (Knaul y col., 1998) (ecuación 7) que plantea la dependencia de la viscosidad intrínseca con el PM promedio.

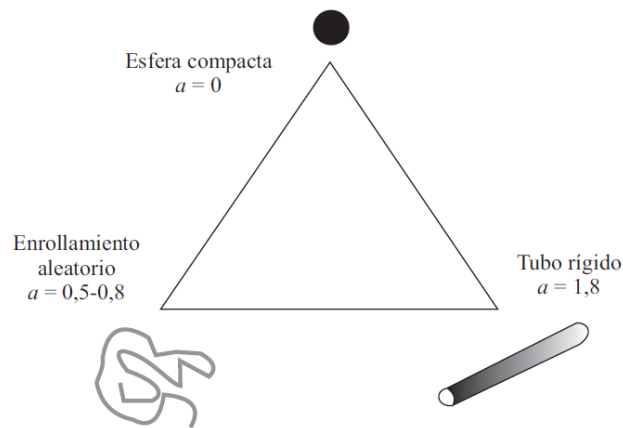
$$[\eta] = K M_v^a \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde  $K$  y  $a$  son constantes empíricas válidas sólo para un sistema establecido de solvente-polímero, las cuales dependen de la naturaleza del polímero, del sistema de disolvente utilizado y temperatura (Knaul y col., 1998). Generalmente el valor de  $K$  varía entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . El exponente  $a$  permite estimar la flexibilidad de una macromolécula y su conformación en

## Materiales y métodos

---

solución haciendo uso del triángulo de Haug (Harding, 1997; Brugnerotto y col., 2001). Este triángulo describe los tres niveles de conformaciones macromoleculares: esfera compacta, tubo rígido y enrollamiento al azar, representados en cada uno de los vértices, los cuales dependen del valor de  $a$  (Figura 18) (Gartner y col., 2010).



**Figura 18.** Triángulo de Haug (Gartner y López, 2010)

En general, entre más cargas tiene el polisacárido su conformación es más cercana a un tubo rígido. Mientras que polisacáridos no cargados se comportan más como enrollamientos al azar (Smidsrød y col., 1971).

## Materiales y métodos

---

### III.3.1.2.2. Por cromatografía de exclusión molecular (SEC)

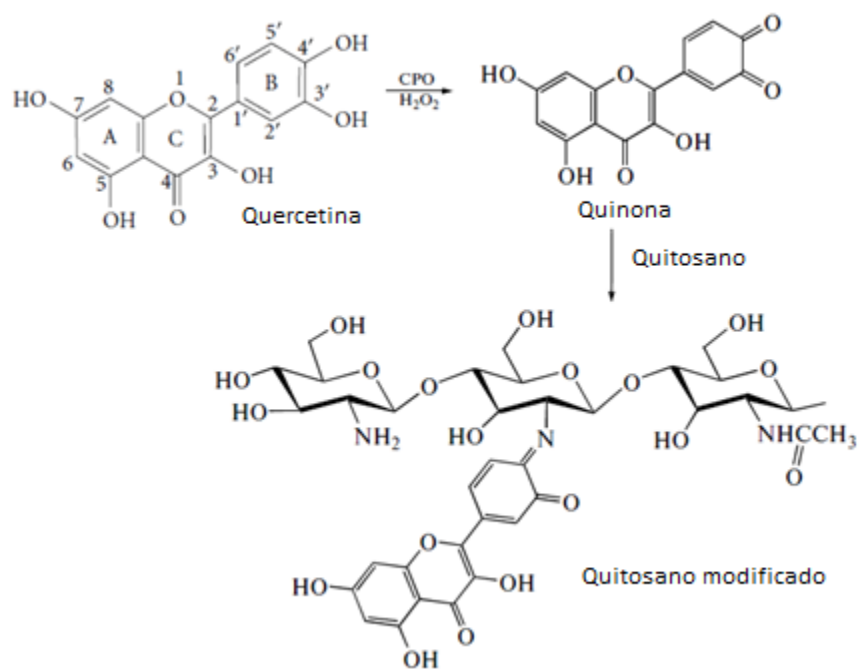
Adicionalmente se evaluó la masa molar por SEC con detección de índice de refracción (DR) y calibración directa con estándares de Pululanos. Se empleó un cromatógrafo Waters, con una bomba binaria Waters modelo 1525, con inyector automático Waters modelo 717 plus y detector Refractómetro Diferencial (DR), Waters 2414, modelo 410. (T = 30 °C). La separación se realizó con un set de 5 columnas Ultrahydrogel (Waters, 7.8 mm × 300 mm). Tamaños de poro: 120, 250, 500, 1000, 2000 Å. Límites de fraccionamiento:  $5 \times 10^3$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , y  $7 \times 10^6$  g/mol. Como fase móvil se empleó buffer  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ ; pH= 4,50; 0,50 M, a un flujo de 0,8 ml/min y con un volumen de inyección de muestra de 200  $\mu\text{l}$ . Para la calibración directa se emplearon estándares de Pululanos (Polimaltotriosa): Pullulans Shodex Standard P-82. Lote N° 90401 – Showa Denko.

### III.3.2. Derivatización del quitosano

Con el objeto de potenciar las propiedades antioxidantes del Ch, se realizó la modificación química del mismo con el flavonoide Q a través de la reacción catalizada por la enzima CPO la cual actúa sobre el flavonoide transformándolo en la correspondiente quinona altamente reactiva frente a Ch, obteniéndose el aducto quitosano-quercetina (Ch-Q), por reacción del

## Materiales y métodos

catecol de la forma *orto*-quinónica de Q y el grupo NH<sub>2</sub> de Ch. En la figura 19 se muestra el mecanismo de reacción de Ch con Q. Para estos ensayos se siguió la metodología propuesta por Torres y col., 2012, con algunas modificaciones.



**Figura 19.** Mecanismo de reacción de Ch con Q: oxidación enzimática de Q, formación de quinona y obtención del aducto Q-Ch (Torres y col., 2012)



## Materiales y métodos

---

En una primera etapa se realizó la oxidación enzimática del flavonoide Q. La reacción se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 20% de isopropanol y 80 % de buffer fosfato (0,1 M, pH 5,5),  $5 \times 10^{-5}$  M de Q, 100 nM de CPO, 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0,537 M de KCl. Se trabajó a una temperatura de 25°C y bajo continua agitación. La enzima utilizada presentó una actividad de 14400 U/ml para la cloración de la monoclorodimedona (MCD). El avance de la reacción fue monitoreado a través del consumo de absorbancia en el rango de 200 – 600 nm, y la formación de una nueva banda de absorción a 300 nm. La conversión enzimática se llevó a cabo por triplicado. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos SPECORD S600 MARCA ANALYTIK JENA.

Una vez determinado el tiempo óptimo de oxidación de la Q, se adicionó 0,8 % p/v de Ch nativo, previa acidificación de la mezcla con ácido acético. Luego de 12 h de agitación, se elevó el pH de la mezcla con la adición de NaOH 1M hasta obtener el precipitado de Ch modificado. Posteriormente, se lavó el sólido obtenido con isopropanol al 50% v/v en agua a fin de remover la Q oxidada sin reaccionar. Finalmente, el Ch modificado se secó en estufa de vacío (Arcano, Modelo DZF 6020) a 40°C, hasta peso constante.

## Materiales y métodos

---

### III.3.3 Caracterización química del Ch derivatizado

#### III.3.3.1. Cuantificación de polifenoles y eficiencia de reacción de derivatización

El contenido de polifenoles presentes en la molécula derivatizada fue determinado según el método de Folin-Ciocalteu (Maurya y col., 2010; Pourmorad y col., 2006). Este método fue empleado inicialmente para el análisis de proteínas; posteriormente, se extendió para fenoles totales en vino y luego para diversas aplicaciones. Se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene como principio activo una mezcla de ácidos de tungsteno y molibdeno que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando un complejo cromógeno fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). Este complejo coloreado azul-verdoso tiene un máximo de absorbancia a 750 nm, permitiendo cuantificar los polifenoles presentes (Bordeau y col., 2000).

Para determinar el contenido de polifenoles se disolvió la muestra de Ch y Ch-Q al 0,5% p/v en ácido acético 1% v/v. En un tubo de ensayo se adicionó 1 ml de muestra, 0,25 ml (5% v/v) del reactivo de Folin-Ciocalteu y 3,75 ml de buffer carbonato de sodio (0,1 M, pH 10,00). Se trabajó con un volumen final de 5 ml. Se agitó para homogeneizar y se dejó reposar a oscuras a temperatura ambiente durante 60 min a fin de estabilizar la reacción. Luego se midió la absorbancia a 750 nm. Las medidas de

## Materiales y métodos

---

absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos SPECORD S600 MARCA ANALYTIK JENA.

La eficiencia de reacción de derivatización del Ch se determinó a través de una curva de calibración, utilizando como patrón el flavonoide quercetina. Se prepararon soluciones con isopropanol a diferentes concentraciones (0,302  $\mu\text{g/ml}$ , 3,022  $\mu\text{g/ml}$  y 9,067  $\mu\text{g/ml}$ ), y se midió la absorbancia a 750 nm. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de las soluciones. Luego con el valor de absorbancia obtenido de la muestra se calculó la concentración de Q presente en la misma y se determinó de esta manera la eficiencia de reacción expresada en % en función del patrón utilizado.

### III.3.3.2. Propiedad antioxidante

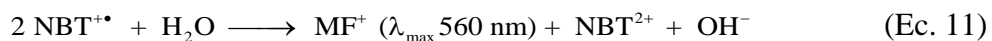
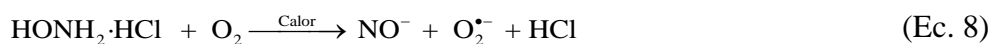
La actividad antioxidante *in vitro* se evaluó frente a especies reactivas de oxígeno (EROS). Las EROS, tales como radical anión superóxido,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , y radical hidroxilo,  $\bullet\text{OH}$ , son especies químicas que contienen en su estructura uno o más electrones desapareados, lo que los convierte en compuestos altamente inestables y de gran actividad asociada a la necesidad de ceder o tomar un electrón de una estructura molecular adyacente con la finalidad de estabilizarse (García, 2002).

## Materiales y métodos

---

### III.3.3.2.1. Desactivación de $O_2^{\bullet-}$

La capacidad antioxidante fue determinada mediante la evaluación de la eficiencia para la desactivación del radical  $O_2^{\bullet-}$  (como modelo de especie reactiva de oxígeno). La desactivación de  $O_2^{\bullet-}$  se determinó por el método basado en la autooxidación de hidroxilamina (ecuación 8) en presencia de Azul de Nitrotetrazolium ( $NBT^{2+}$ ) que es reducido a monoformazan ( $MF^+$ ) (ecuación 9 a 11) (Sabu y col., 2002). El  $MF^+$  tiene un máximo de absorción a 560 nm. Se determinaron los porcentajes de desactivación (% D) a partir de las absorbancias en ausencia y presencia de Ch y Ch-Q.



El medio de reacción fue provisto por buffer fosfato 50 mM pH 8 (500  $\mu$ l), se añadieron NBT 1 mM (300  $\mu$ l), EDTA 1 mM (100  $\mu$ l), clorhidrato de hidroxilamina 5 mM (500  $\mu$ l), completando con la solución de antioxidante (Ch y Ch-Q) y/o agua hasta volumen final de 3 ml. Se evaluaron concentraciones del antioxidante de 0,11 mg/ml, 0,22 mg/ml y 0,44 mg/ml. Luego de un período de incubación de 1 h a 37°C, se leyeron las respectivas absorbancias a 560 nm. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un

## Materiales y métodos

---

espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos SPECORD S600 MARCA ANALYTIK JENA.

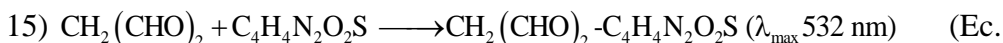
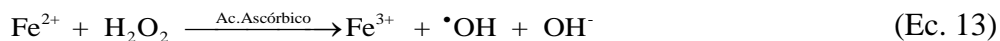
El % D de ( $O_2^{\bullet-}$ ) fue calculado de acuerdo a la ecuación 12.

$$\% D = 100 \frac{(A_0 - A_x)}{A_0} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde  $A_0$  es el valor de absorbancia obtenida para la solución control, sin antioxidante, y  $A_x$  es el valor de absorbancia en presencia de estos compuestos.

### III.3.3.2.2. Desactivación de $\bullet OH$ : Método de la desoxirribosa

El método se basa en la determinación de la capacidad de un antioxidante para inhibir la formación de malonaldehído (MAD) producido por oxidación de 2-Desoxi-D-ribosa (ecuación 13) por  $\bullet OH$  generado a partir de la reacción de Fenton a pH 7,4 (ecuación 14). El MAD en presencia de TBA forma un aducto ( $\lambda_{\text{máx}}$ : 532 nm) cuya inhibición se traduce a comportamiento antioxidante de Ch o Ch-Q (ecuación 15 y 16).



## Materiales y métodos

---

El medio de reacción fue provisto por buffer fosfato 50 mM pH 7,4 (400  $\mu$ l), se añadieron 2-Desoxi-D-ribosa 10 mM (560  $\mu$ l), peróxido de hidrógeno 100 mM (50  $\mu$ l), cloruro férrico 1 mM (50  $\mu$ l), EDTA 5 mM (50  $\mu$ l), ácido ascórbico 5 mM (40  $\mu$ l), completando con la solución de antioxidante (Ch o Ch-Q) y/o agua hasta volumen final de 2 ml. Se evaluaron concentraciones del antioxidante de 0,11 mg/ml, 0,22 mg/ml y 0,44 mg/ml. Luego de un período de incubación de 1 h a 37°C, se adicionó TBA 1 % p/v (1 ml) y TCA 5,6 % p/v (1 ml), y se mantuvieron las muestras a 95°C durante 20 min, para posteriormente leer las respectivas absorbancias. Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos SPECORD S600 MARCA ANALYTIK JENA.

El % de desactivación (% D) de ( $\cdot$ OH) fue calculado de acuerdo (ecuación 12).

### III.3.4. Obtención del film biodegradable

#### III.3.4.1. Film a base de Ch nativo y Ch derivatizado

Se utilizó la misma metodología para la obtención de ambos films, de Ch y Ch-Q, según el método propuesto por Bourbon y col. 2011, con algunas modificaciones. Se disolvió 1% p/v de Ch y Ch-Q en solución de ácido láctico al 1% p/v. Para lograr una completa disolución, se dejó agitar, usando agitador magnético, durante 5 h, a temperatura ambiente. Luego, con el objetivo de separar impurezas, la solución se centrifugó durante 10 min a

## Materiales y métodos

---

5000 x g; se utilizó una ultracentrífuga Thermo Fisher Scientific, Modelo Sorvall ST16R. A la solución resultante, se le adicionó glicerol al 1% p/v como plastificante, y Tween 80 al 0,2% p/v como surfactante. A fin de obtener una película de espesor lo más uniforme posible, se tomó un volumen constante (20 ml) de la solución formadora de film y se colocó en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Luego se secaron en estufa (San Jor, Modelo Serie SL DB,) a 35°C durante 40 h. Todas las propiedades se evaluaron inmediatamente después de que los recubrimientos fueron removidos de las placas.

### **III.3.5. Caracterización del film biodegradable**

#### **III.3.5.1. Propiedades físico-químicas**

##### **III.3.5.1.1. Medida del espesor y densidad del film**

El espesor, expresado en  $\mu\text{m}$ , fue determinado utilizando un micrómetro digital (Insize, Serie 3109,). De cada muestra se tomaron medidas en 5 lugares diferentes, en posiciones aleatorias, del film y se calculó el promedio de ellas. La densidad fue determinada dividiendo el peso del film por su volumen, donde el volumen fue calculado multiplicando el área del film por su espesor (Siripatrawan y col., 2010).

## Materiales y métodos

---

### III.3.5.1.2. Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas evaluadas sobre las películas a base de Ch y Ch-Q, fueron la transparencia y la opacidad. Para su determinación, cada muestra del film se cortó en piezas rectangulares que se colocaron directamente en las cubetas del espectrofotómetro UV-Vis (SPECORD S600 MARCA ANALYTIK JENA) y se midió la absorbancia a longitudes de onda de 600 nm y 500 nm, respectivamente. Para realizar las mediciones, se utilizó el aire como referencia. Las medidas fueron realizadas por triplicado y se calculó un promedio de las mismas. El valor de transparencia del film se obtuvo según la ecuación 17 (Kanatt y col., 2012),

$$T_{\text{film}} = \frac{\overline{\text{Abs}}_{600\text{nm}}}{\overline{E}(\text{mm})} \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde  $\overline{\text{Abs}}_{600\text{nm}}$  corresponde a la absorbancia promedio del film medida a 600 nm y  $\overline{E}$ , al espesor promedio del film expresado en mm.

La opacidad del film se calculó según la ecuación 18 (Kanatt y col., 2012),

$$O_{\text{film}} = \overline{\text{Abs}}_{500\text{nm}} * \overline{E}(\text{mm}) \quad (\text{Ec. 18})$$

Donde  $\overline{\text{Abs}}_{500\text{nm}}$  corresponde a la absorbancia promedio del film medida a 500 nm y  $\overline{E}$ , al espesor promedio del film expresado en mm.



## Materiales y métodos

---

### III.3.5.1.3. Contenido de humedad y solubilidad en agua

El contenido de humedad (H), expresado en %, de los films fue calculado según el método usado por Martins, Cerqueira y Vicente (2012). Para su determinación, se tomaron 50 mg del film y se colocaron en estufa a 105°C durante 24 h hasta alcanzar peso constante. Las medidas fueron realizadas por triplicado. Se determinó la pérdida de peso y se calculó el porcentaje de agua removida del sistema, según ecuación 19,

$$\%H = \frac{M_i - M_f}{M_i} * 100 \quad (\text{Ec. 19})$$

Donde  $M_i$  corresponde al peso inicial de la muestra y  $M_f$ , al peso final.

La solubilidad en agua del film (S), expresado en %, se determinó como el porcentaje de materia soluble del film luego de 24 h de inmersión en agua de acuerdo al método propuesto por Casariego y col., 2009. Una cantidad exactamente pesada del film, previamente secado hasta peso constante, fue sumergida en 50 ml de agua a temperatura ambiente. Luego de 24 h bajo leve agitación, se tomaron las muestras y se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante. Las medidas fueron realizadas por triplicado. Se calculó la solubilidad en agua del film según ecuación 20,

## Materiales y métodos

---

$$\%S = \frac{W_{t\text{ inicial}} - W_{t\text{ final}}}{W_{t\text{ inicial}}} * 100 \quad (\text{Ec. 20})$$

Donde  $W_{t\text{ inicial}}$  corresponde al peso de la muestra seca y  $W_{t\text{ final}}$ , al peso del film seco luego de haber estado inmerso en agua.

### III.3.5.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas del film, tensión en la carga máxima (TS) y deformación en la carga máxima (E), fueron medidas utilizando una máquina universal de ensayos INSTRON (modelo 1125, USA) y según el método estándar ASTM D882-02 (Método de ensayo estándar para determinar las propiedades de tensión de láminas plásticas delgadas). Este método incluye la determinación de las propiedades de tensión de plásticos en forma de láminas finas, incluyendo films de espesor menor a 1,0 mm. Esta norma fue tomada como referencia por diversos autores (Martins y col., 2012; Bourbon y col., 2011; Kanatt y col., 2012; Cerqueira y col., 2012). Se aplicó una velocidad de 500 mm/min, y se trabajó con una celda de carga de 50 N y una separación entre mordazas de 35,00 mm. TS fue expresado en MPa y E, en porcentaje. Para ambos casos se tomó un valor promedio de 10 repeticiones. El ensayo de tracción se realizó a una temperatura de 23°C y una humedad relativa (HR) del 50%. Estas determinaciones fueron realizadas

## Materiales y métodos

---

en el laboratorio de Plásticos del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) Buenos Aires (Argentina).

### III.3.5.3. Propiedades barrera

#### III.3.5.3.1. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) fue determinada según el método ASTM E96-05 (Método de ensayo estándar para determinar la transmisión de vapor de agua de materiales). Este método incluye la determinación de WVP para materiales donde el paso de vapor de agua a través de ellos resulta ser de gran importancia, como ser papel, películas plásticas o de otros materiales. Esta metodología está limitada a aquellas muestras que tengan un espesor no mayor de 32 mm. Esta norma fue tomada como referencia por diversos autores (Martins y col., 2012; Bourbon y col., 2011; Siripatrawan y col., 2010). Se utilizó el ensayo gravimétrico, donde se utilizó una copa de aluminio con una superficie expuesta de 28,26 cm<sup>2</sup> y se trabajó a 50% de HR y 23°C. Los cambios en el peso de la copa fueron registrados cada 12 h durante 7 días utilizando una balanza analítica con una precisión de 0,1 mg (Radwag, AS 220/R2) y se representó gráficamente en función del tiempo, usándose este gráfico para determinar la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR).

El valor de WVP de los films fue calculado según ecuación 21.

## Materiales y métodos

---

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde WVTR es la velocidad de transmisión de vapor de agua ( $\text{g/m}^2 \cdot \text{día}$ ) a través del film, L, el valor promedio de espesor (m) y  $\Delta P$ , la diferencia de presión parcial de vapor de agua (Pa) entre los dos lados del film a la temperatura del ensayo ( $23^\circ\text{C}$ ).

### **III.3.5.3.2. Permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono**

Para la determinación de la permeabilidad al oxígeno ( $\text{O}_2\text{P}$ ) y al dióxido de carbono ( $\text{CO}_2\text{P}$ ) se utilizó el método manométrico siguiendo los lineamientos de la Norma ASTM D1434-82 (2009) (Método de ensayo estándar para determinar la permeabilidad al gas de films y láminas de plástico). La muestra forma una barrera estanca entre dos cámaras, una cámara inicialmente contiene el gas a ensayar y la otra está libre de gas. La presión o el volumen del gas en cámara de recepción se controlan a través del tiempo, y la  $\text{O}_2\text{P}$  se determina a partir del cambio en el volumen o presión. Este método ha sido utilizado por varios investigadores, incluyendo a George y col. (2007), Laohakunjit y Noomhorm (2004) y Raj y col. (2005). La medición de permeabilidad para ambos gases se efectuó a  $23^\circ\text{C}$  y 0% de HR.

## Materiales y métodos

---

Las probetas de las muestras se acondicionaron durante 48 hs bajo las condiciones mencionadas.

### III.3.5.4. Propiedades microbiológicas

#### III.3.5.4.1. Capacidad antimicrobiana *in vitro*

Las propiedades antimicrobianas de los films fueron evaluadas según el método estándar ASTM E2149-01, que considera el efecto causado por la fracción soluble del film. A partir de un cultivo overnight (12 h) de *E. coli* y *S. aureus* en CN, se preparó una suspensión de DO 0,002 a 625 nm (correspondiente a  $\sim 10^7$  UFC/ml) de cada uno de los microorganismos, utilizando buffer fosfato de sodio (0,3 mM) pH=6,8 y pH=5,00. Se trabajó a pH=5,00 ya que fue el valor obtenido cuando se solubilizó el film. Se cortaron pequeños discos del film de 7 mm de diámetro, se esterilizaron con luz UV durante 20 min y se colocó un disco por cada tubo de ensayo que contenía 7 ml de la suspensión de trabajo. Todos los tubos fueron incubados en agitador orbital para cultivo (FERCA, Buenos Aires, Argentina) a 37°C y 60 rpm, durante 6 h. Se tomaron muestras a las 0, 1, 3 y 6 h, se realizó siembra en superficie en placas que contenían AN. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Se realizó el recuento de las colonias que sobrevivieron expresando el resultado como UFC/ml. La actividad antimicrobiana fue expresada en términos de porcentaje de reducción (%R) del microorganismo luego de estar en contacto con el film, comparado con el número de bacterias

## Materiales y métodos

---

del inóculo en la solución buffer sin el film, a cada tiempo. El porcentaje de reducción fue calculado según ecuación 22 (Bozic, Gorgieva y Kokol, 2012).

$$\%R = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (\text{Ec. 22})$$

Donde A corresponde a las UFC/ml del tubo que contiene buffer pH=5,00 sin film, y B a las UFC/ml del tubo que contiene el disco de film.

### III.3.5.5. Propiedades antioxidantes

#### III.3.5.5.1. Desactivación de radical $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$

Para la determinación de la capacidad antioxidante del film, se evaluaron las propiedades antioxidantes frente a  $O_2^{\bullet-}$  y  $\bullet OH$  de la fracción soluble del film a base de Ch-Q, comparándolo con la fracción soluble del film a base de Ch. Para su evaluación, se utilizó la misma metodología descrita para el estudio de la actividad antirradicalaria de la molécula derivatizada (III.3.3.2.1. y III.3.3.2.2.), con la diferencia de que la solución antioxidante a evaluar correspondía a la fracción soluble de ambos films. Para ello, se disolvieron 50 mg de muestra en 5 ml de agua bidestilada, se dejó bajo agitación suave, a temperatura ambiente, durante 24 h. Para los ensayos, el medio de reacción se completó con la solución de antioxidante (fracción soluble de Ch y Ch-Q) y/o agua hasta volumen final, evaluándose

## Materiales y métodos

---

una concentración de 0,38 mg/ml. El cálculo se realizó teniendo en cuenta el peso de cada film y la concentración empleada en la formulación de las películas.

### **III.3.6. Estabilidad de vegetales recubiertos**

#### **III.3.6.1. Capacidad antimicrobiana**

Se determinó la capacidad antimicrobiana de las muestras de zanahorias con y sin recubrimiento y almacenadas durante 14 días bajo refrigeración. Se trabajó con zanahorias frescas compradas en un centro comercial de la ciudad de Villa María (Córdoba, Argentina). Las mismas fueron seleccionadas según su forma, tamaño y aspecto a fin de partir de una muestra lo más uniforme posible y sin daños. Luego se lavaron con agua potable durante 1 min, se descartaron los extremos de cada zanahoria, se pelaron y se cortaron en rodajas de 5 mm de espesor. Se trabajó con 3 unidades experimentales: SR = rodajas de zanahorias control (sin recubrir); Ch = rodajas de zanahorias recubiertas con solución formadora de film a base de Ch; Ch-Q = rodajas de zanahorias recubiertas con solución formadora de film a base de Ch-Q. Cada unidad fue de 100 g. Se procedió a recubrir las zanahorias, en ambas caras, por inmersión en cada una de las soluciones por un periodo de 1 min. Luego, las muestras se secaron con papel para eliminar el exceso del recubrimiento e inmediatamente se coloraron en bandejas y se almacenaron bajo refrigeración a 4 °C y 60% ± 5% de HR durante 14 días.

## Materiales y métodos

---

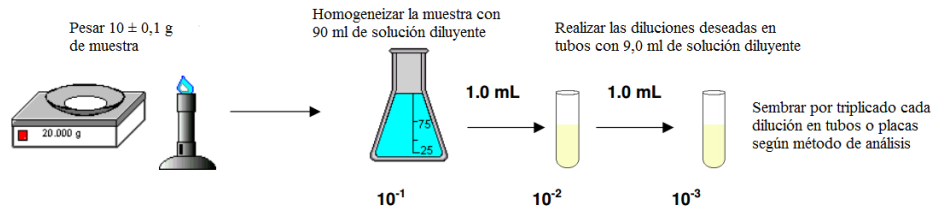
Se realizó el análisis microbiológico durante este período a 4 tiempos diferentes: 0, 4, 8 y 14 días. Se realizó el recuento de microorganismos mesófilos viables (solamente al inicio del ensayo), microorganismos psicrótrofos, bacterias coliformes totales, *S. aureus* y hongos y levaduras (ICMSF: 1983; 2000). Los ensayos antimicrobianos se realizaron por triplicado para cada microorganismo.

### **III.3.6.1.1. Procedimiento para el análisis microbiológico**

Para la preparación del homogeneizado se pesaron  $10 \pm 0,1$  g de zanahorias de cada unidad experimental. Se colocaron en una bolsa de plástico estéril y se homogenizó en 90 ml de agua peptonada estéril (0,1 % p/v) en stomacher (Arcano, Modelo Scientz-11L) a 600 rpm, 25°C, durante 5 min. Se dejó reposar el homogeneizado 15 min a temperatura ambiente para permitir la reactivación de los microorganismos. Se tomó 1 ml de dicho homogeneizado (considerado una dilución  $10^{-1}$ ) previamente agitado, y se colocó en un tubo conteniendo 9 ml de la solución diluyente, obteniendo así la dilución  $10^{-2}$ . Se repitió el paso anterior hasta llegar a la dilución deseada y se procedió a la siembra en placas y/o tubos con los respectivos medios de cultivos. En la figura 20 se presenta un esquema de la preparación de las muestras, previo a su análisis microbiológico.



## Materiales y métodos



**Figura 20.** Esquema del procedimiento de preparación de las muestras de zanahoria para realizar el análisis microbiológico (adaptado de *Camacho, 2009*).

(1) Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables

Se realizó el recuento en placa por siembra en superficie. Para ello se añadió a cada placa estéril, 15 ml de agar PCA fundido y se lo dejó solidificar. Se tomó 0,1 ml de cada una de las diluciones y se lo depositó en la superficie del agar, para luego extenderlo con espátula de Drigalsky. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, de cada una de las muestras, para determinar si ejerce efecto antimicrobiano algún de los dos recubrimientos evaluados. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

(2) Recuento total de microorganismos psicrótrofos

Se realizó el recuento en placa por siembra en superficie. Para ello se añadió a cada placa estéril, 15 ml de agar PCA fundido y se lo dejó solidificar. Se tomó 0,1 ml de cada una de las diluciones y se lo depositó en

## Materiales y métodos

---

la superficie del agar, para luego extenderlo con espátula de Drigalsky. Las placas fueron incubadas a 4 °C durante 7 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación bajo refrigeración, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, de cada una de las muestras, para determinar si ejerce efecto antimicrobiano algún de los dos recubrimientos evaluados. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

### (3) Recuento de bacterias coliformes totales

Se realizó el recuento de coliformes totales en tubos. Para ello se añadió 1 ml de cada una de las diluciones del homogenizado en tubos de Caldo MacConkey, simple concentración y con campana de Durham (utilizando 3 tubos por cada dilución). Se incubaron los tubos a 37°C durante 24-48 h. Pasadas las primeras 24 h, se examinaron los tubos y se anotaron aquellos que mostraron producción de gas; se volvieron a estufa los tubos negativos para su incubación durante 24 h más. Se consideran tubos positivos aquellos que presenten viraje del indicador de pH, púrpura de bromocresol, del violeta al amarillo (fermentación de la lactosa) y producción de gas. Pasadas las 48 h, se anotaron los tubos con producción gas. La formación de gas a las 24 o 48 h se considera evidencia suficiente de la presencia de coliformes. Para realizar luego la determinación de coliformes fecales, se seleccionaron los tubos de gas positivos y se siguió el procedimiento descrito para la determinación de coliformes de origen fecal.

## Materiales y métodos

---

### a. Determinación de coliformes fecales

A partir de cada tubo positivo para coliformes totales, se tomó una ansada y se colocó en un tubo que contenía 10 ml de Caldo EC con campana de Durham. Los tubos fueron incubados a 45°C durante 48 h. Una vez terminado el tiempo de incubación, se evaluó si los tubos presentaron turbidez y producción de gas en la campana Durham, considerándose este resultado como positivo. Para realizar luego la prueba confirmativa de *E. coli*, se seleccionaron los tubos positivos y se siguió el procedimiento descrito para la determinación de *E. coli* por la técnica del Número más probable (NMP).

### b. Determinación de *E. coli* por técnica de NMP

A partir de cada tubo positivo para coliformes fecales, se tomó una ansada y se sembró en estrías por agotamiento en agar EMB para su aislamiento. Las placas fueron incubadas en posición invertida a 35°C por 24 h. Una vez finalizado el tiempo de incubación, a las colonias rojas con o sin brillo metálico, se pasaron a un tubo de agar nutritivo inclinado, y se incubaron a 35°C durante 24 h. Se realiza tinción de Gram y se observa al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos. Luego se realiza la identificación bioquímica de *E. coli* mediante pruebas I.M.Vi.C.: ensayos para indol (I), rojo de metilo (RM), Voges Proskauer (VP) y citrato sódico (C). Se considera como *E. coli* a los microorganismos

## Materiales y métodos

---

que presenten resultado positivo para I y RM, y negativo para VP y C. El NMP de *E. coli* por gramo de alimento, se determina utilizando la tabla de NMP, en función de los tubos de caldo EC, cuyas cepas dan positivas a las pruebas bioquímicas.

#### (4) Recuento, aislamiento e identificación de *S. aureus*

Se realizó el recuento en placa por siembra en superficie. Se tomó con pipeta estéril, 0,1 ml de las diluciones correspondientes (por triplicado) y se depositó en la superficie de placas de petri con agar MS. Las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C durante 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de todas las colonias características de *S. aureus* en las placas que presentaron entre 20 y 200 colonias, de cada una de las muestras. Las colonias características de este microorganismo en MS se presentan como colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo.

Estas colonias (o un número representativo de las mismas) se someten a la prueba de la coagulasa, para su confirmación bioquímica. Considerando la proporción de colonias que resultó positiva para la prueba de la presencia de la enzima coagulasa y la dilución, se calcula el número total de estafilococos coagulasa positiva por gramo de muestra.

Con las colonias seleccionadas para su tipificación, se procede de la siguiente manera:

## Materiales y métodos

---

- Sembrar las colonias en tubos con agar nutritivo inclinado e incubarlos a 35°C durante 24 h.
- Transcurrido el período de incubación, se realiza tinción de Gram y se observa al microscopio la presencia de cocos Gram positivos.
- De presentarse cultivos puros, se los somete a la Prueba de la coagulasa.

La Prueba de la coagulasa se utiliza de manera específica para diferenciar especies dentro del género *Staphylococcus*. Mediante esta prueba se puede comprobar la facultad del microorganismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. Para esta prueba se deben hacer subcultivos en Caldo Infusión Cerebro Corazón, e incubarlo a 35°C durante 24 h. Se colocan 0,3 ml de los cultivos resultantes en tubos estériles, y se adicionan 0,3 ml de plasma de conejo. Se incuban a 35°C. Luego de 4 h de incubación, se examinan los tubos para ver si el medio aparece coagulado, en caso de ser negativo se colocan nuevamente en estufa durante 24 h. La formación de un coágulo o filamentos de fibrina bien visibles resulta positivo e indicativo de producción de coagulasa. La coagulación puede ser completa o parcial. La prueba es negativa si no hay formación de coágulos y la suspensión se mantiene homogénea.

## Materiales y métodos

---

### (5) Recuento de hongos y levaduras

Se realizó el recuento en placa por siembra en superficie. Para ello se añadió a cada placa estéril, 15 ml de agar Hongos y Levaduras fundido y se lo dejó solidificar. Se tomó 0,1 ml de cada una de las diluciones y se lo depositó en la superficie del agar, para luego extenderlo con espátula de Drigalsky, hasta que la superficie del agar quede seca. Las placas fueron incubadas en posición invertida a 37°C durante 5 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 20 y 200 colonias, de cada una de las muestras. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

### **III.3.6.1.2. Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, empleando el software Statgraphics Centurion XV en su versión 15.2.05., mediante análisis de la varianza ANOVA multifactorial, con el objetivo de comparar si los factores tratamientos y repeticiones, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el recuento de microorganismos, También se realizó la prueba de Rangos Múltiples (LSD) y Prueba de Hipótesis, con un nivel de significancia del 95,0 %.

## Materiales y métodos

---

### III.3.6.2. Actividad antioxidante

Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de los vegetales, se realizó la determinación del contenido de ácido ascórbico (AA) y  $\beta$ -caroteno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El equipo utilizado (ThermoScientific Ultimate 3000) cuenta con una bomba cuaternaria, detector UV/Vis, detector de arreglo de diodos y un inyector de 10  $\mu$ l, y la adquisición y procesamiento de datos se realizó por Software Chromeleon. Para todas las muestras, incluido los patrones, se utilizó una columna C<sub>18</sub> LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5  $\mu$ m). Las curvas de calibración para ambos casos fueron obtenidas al graficar, en software OriginPro8, de OriginLab Corporation, el área del pico versus la concentración de la solución estándar empleada. A partir de estas curvas se cuantificó el contenido de AA y  $\beta$ -caroteno de las muestras. La concentración de AA fue calculada y expresada en mg /100 g de muestra fresca, mientras que la de  $\beta$ -caroteno se expresó en  $\mu$ g/g.

Se cuantificó el contenido de AA y de  $\beta$ -caroteno de muestras de zanahorias SR, y recubiertas con Ch y Ch-Q. Las muestras fueron acondicionadas siguiendo la misma metodología utilizada para evaluar la capacidad antimicrobiana de los vegetales recubiertos (III.3.6.1.). Las muestras de zanahorias de las tres unidades experimentales se almacenaron bajo refrigeración durante 10 días y se realizó la determinación de los

## Materiales y métodos

---

compuestos antioxidantes a 4 tiempos diferentes: 0, 3, 7 y 10 días. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada compuesto.

### **III.3.6.2.1. Determinación del contenido de AA**

Numerosos métodos han sido desarrollados para estimar el contenido de AA; sin embargo, la técnica HPLC, usando un detector UV, es actualmente la más utilizada para realizar el análisis de AA en alimentos (Arayne y col., 2009).

El proceso de extracción del AA de una muestra es un paso determinante para el análisis e identificación del contenido de vitamina C en muestras tan complejas como las zanahorias. Es esencial lograr una extracción eficiente del AA previniendo su oxidación. En la bibliografía diferentes métodos de extracción han sido reportados usando solventes ácidos como soluciones acuosas de MPA, ácido cítrico, acético, oxálico y ortofosfórico (Franke y col., 2004; Kabasakalis y col., 2000; Kall y col., 1999).

#### **A) Extracción de AA**

El proceso de extracción de AA se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Ismail y Fun (2003) y Zaman, Akram y Rehman (2013), con algunas modificaciones.



## Materiales y métodos

---

Como primer paso, se preparó la solución extractora (SE) conteniendo 17% de MeOH, 3,6% de MPA y 9,6% de ácido acético. La solución fue filtrada por embudo Buchner, se rotuló y se almacenó bajo refrigeración. Previo a su uso, se adicionó el antioxidante BHT al 0,1% p/v en SE.

Con el fin de evitar cualquier pérdida del antioxidante por fotooxidación y temperatura, se trabajó en un ambiente oscuro y fresco, y todo el material fue protegido con papel aluminio.

Para el ensayo, se pesaron 10 g de muestra y se adicionaron 75 ml de SE. La muestra fue triturada usando una procesadora (Electrolux, Modelo IBE20) a alta velocidad durante 3 min, hasta obtener una suspensión suave.

Se filtró por embudo Buchner y se centrifugó a 5000 rpm y 4°C durante 30 minutos.

El líquido sobrenadante se filtró nuevamente por embudo Buchner y luego por filtro de membrana MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diámetro.

Antes de inyectar la muestra en el equipo HPLC, se diluyó la misma al 50% en la fase móvil (FM).

### **B) Análisis de AA por HPLC**

Se filtraron las FM (MeOH y ácido acético) con membranas MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF, 0,22 µm de poro, 47 mm de

## Materiales y métodos

---

diámetro. Se desgasificaron durante 30 min en baño de ultrasonido (Testlab, Modelo TB 02 TA) a 80 w de potencia.

Se acondicionó el equipo HPLC según metodología de análisis (Frenich y col., 2005). Se utilizó como fase móvil 65% MeOH:35% ácido acético 0,05% v/v, a un flujo de 0,9 ml/min y a una temperatura de 29°C.

Previo a su inyección, las muestras se diluyeron al 50% en FM y se filtraron por membranas MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diámetro.

Para la identificación del AA en la muestra, se registraron los tiempos de retención y los espectros obtenidos por el DAD, y se compararon con el del patrón inyectado.

### C) Cuantificación de AA

Para la cuantificación del AA, se realizó una curva de calibración en HPLC (área HPLC vs. concentración mg/100 g). Se prepararon 5 diluciones del patrón de manera que cubran el rango de concentración de AA en la muestra de zanahoria: 3 a 8 mg/100g (Howard y col., 1999; Simões y col., 2009). Se inyectaron las soluciones patrones y se registraron las áreas para construir la curva de calibración y determinar la concentración de AA en cada muestra analizada. La cuantificación se realizó por el método de estándar externo, donde se analizó originalmente la muestra por duplicado y

## Materiales y métodos

---

posteriormente se analizó la muestra adicionada a dos niveles de concentración, con adiciones de 5 mg/ 100 g y 10 mg/ 100 g.

### **III.3.6.2.2. Determinación del contenido de $\beta$ -caroteno**

Desde finales de la década del 70, la técnica de HPLC se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado para la determinación de carotenoides, principalmente debido a que la técnica produce una rápida separación, no es destructiva y, lo más importante, logra una mejor resolución (Taylor, 1983).

Para realizar el análisis y cuantificación del  $\beta$ -caroteno, se procedió según metodología descrita por Assunção y Mercadante (2003), con algunas modificaciones.

#### **A) Extracción de pigmentos**

Con el fin de evitar la degradación de los pigmentos, todas las operaciones se llevaron a cabo en oscuridad y se protegieron los pigmentos con papel de aluminio.

En primer lugar se enfrió la acetona. Luego se pesaron 20 g de zanahoria y se colocaron en una procesadora, se agregaron 50 ml de acetona y se trituró a alta velocidad por 5 min. Se filtró con embudo Buchner.

## Materiales y métodos

---

Se transfirieron los pigmentos a éter de petróleo. Se colocaron 50 ml de éter en una ampolla de decantación y se adicionó la solución del pigmento- acetona. Se adicionó agua y se dejó separar las dos fases. Se descartó la capa inferior acuosa. Se adicionó más solución del pigmento y se repitió el proceso. Cuando todos los pigmentos se encontraron en éter se lavó 4 veces más con agua, para tener la certeza de que toda la acetona fue retirada.

Por último, se recolectó la solución de los pigmentos en un erlenmeyer tapado y se adicionó una pequeña porción de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Se dejó la solución en el refrigerador por lo menos 15 min.

Se concentró la solución en evaporador rotatorio a vacío, a  $40^\circ\text{C}$  y 100 rpm, hasta aproximadamente 2 ml. Se secó el extracto bajo nitrógeno y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **B) Análisis de $\beta$ -caroteno por HPLC**

Se filtraron las FM (MeOH y acetonitrilo) con membranas MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF,  $0,22\ \mu\text{m}$  de poro, 47 mm de diámetro. Se desgasificaron durante 30 min en baño de ultrasonido a 80 w de potencia.

Se acondicionó el equipo HPLC según metodología de análisis. Se utilizó como FM 90% MeOH:10% Acetonitrilo a un flujo de 1 ml/min y a una temperatura de  $29^\circ\text{C}$ .

## Materiales y métodos

---

Previo a su inyección, se redisolviaron los extractos secos en 3 ml de MeOH grado HPLC y se sonicaron por 20 min. Se filtraron las muestras por membranas MILLIPORE HV (Durapore) en PVDF, 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, 13 mm de diámetro, y se inyectaron inmediatamente luego de ser redisoluertos.

Para la identificación del  $\beta$ -caroteno en la muestra, se registraron los tiempos de retención y los espectros obtenidos por el DAD, y se compararon con el del patrón inyectado.

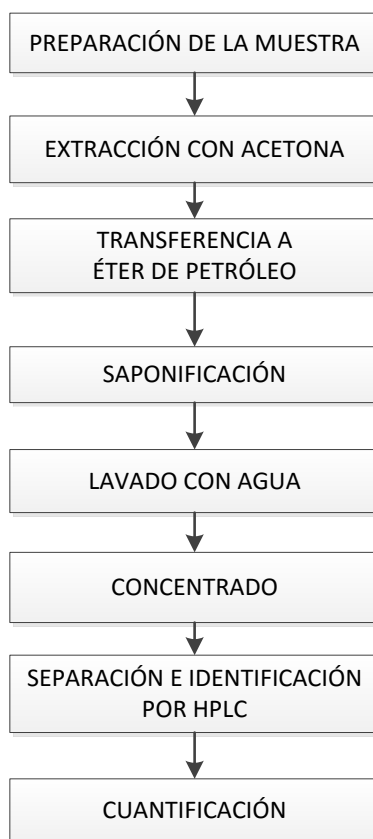
### C) Cuantificación de $\beta$ -caroteno

Para la cuantificación del  $\beta$ -caroteno, se realizó una curva de calibración en HPLC (área HPLC vs. concentración  $\mu\text{g/g}$ ). La concentración del patrón de  $\beta$ -caroteno se determinó por espectroscopia UV-Vis. Para ello, se disolvió el patrón de  $\beta$ -caroteno en diclorometano, para luego preparar 5 diluciones en MeOH. Sus concentraciones fueron ajustadas por espectroscopía usando el coeficiente de absorptividad molar  $\epsilon_{\text{mol}}$  Diclorometano = 127200  $\text{l M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 460 \text{ nm}$  y  $\epsilon_{\text{mol}}$  MeOH = 136400  $\text{l M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 450 \text{ nm}$  (Craft y col., 1992), respectivamente. Mediante la curva de calibración se cubrió el rango de concentración de  $\beta$ -caroteno presente en la muestra de zanahoria: 60 a 120  $\mu\text{g/g}$  (Fikselová y col., 2008). Se inyectaron las soluciones patrones y se registraron las áreas para construir la curva de calibración y determinar la concentración de  $\beta$ -caroteno en cada muestra analizada.

## Materiales y métodos

---

En la figura 21 se presenta un diagrama resumido con las etapas para la determinación de carotenoides.



**Figura 21.** Diagrama representativo de las etapas necesarias para la determinación del contenido de  $\beta$ -caroteno de muestras de zanahorias.

## Materiales y métodos

---

### **III.3.6.2.3. Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, empleando el software Statgraphics Centurion XV en su versión 15.2.05., mediante análisis de la varianza ANOVA multifactorial, con el objetivo de comparar si los factores tratamientos y repeticiones, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de AA y  $\beta$ -caroteno. También se realizó la prueba de Rangos Múltiples (LSD) y Prueba de Hipótesis, con un nivel de significancia del 95,0 %.

## Resultados y discusión

---

### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## Resultados y discusión

---

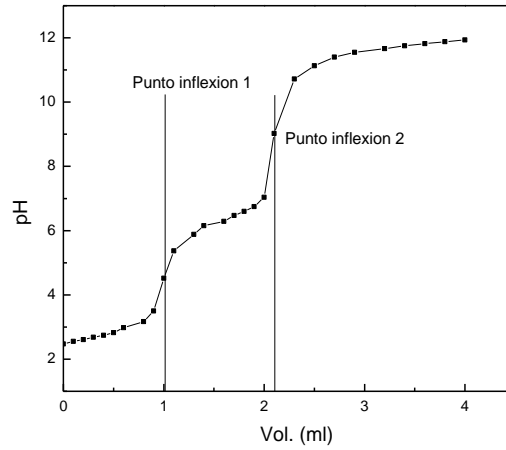
### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### IV. 1. Caracterización del quitosano nativo

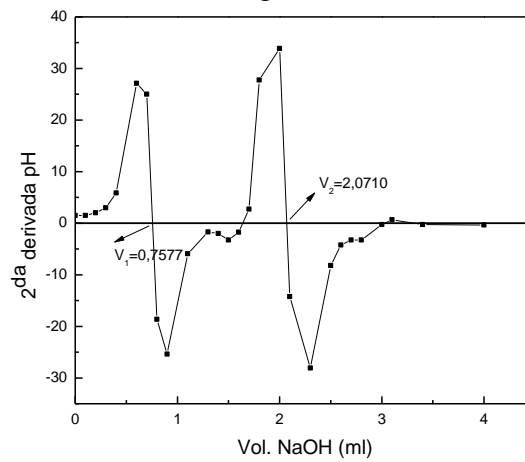
##### IV. 1.1. Determinación del grado de desacetilación (% DGA)

En la determinación del % DGA por titulación potenciométrica, la curva correspondiente permite, mediante la diferencia entre los volúmenes de NaOH de cada punto de inflexión de la curva, determinar el volumen de base equivalente al de ácido necesario para protonar los grupos amino de la molécula de Ch (figura 22). Para la determinación exacta de estos puntos se realiza la segunda derivada de la función que representa la variación de pH respecto del volumen de NaOH gastados (figura 23).

## Resultados y discusión



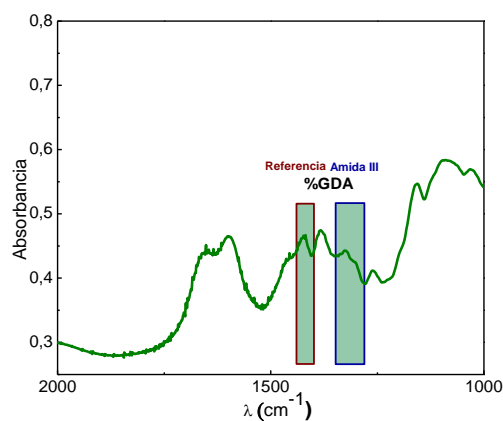
**Figura 22.** Curva de titulación potenciométrica de una solución de Ch nativo de 1g/l



**Figura 23.** Segunda derivada de la función que representa la curva de pH vs. volumen de NaOH gastados para Ch nativo

## Resultados y discusión

La figura 24, corresponde al espectro de absorción en IR que presenta la molécula de Ch y las bandas a 1420 y 1320  $\text{cm}^{-1}$ , a partir de las cuales se puede calcular el % GDA de las muestras analizadas. Estas correlaciones fueron tomadas entre una de las bandas de los grupos amida (I o III), en este caso amida III (1380  $\text{cm}^{-1}$ , aquí desfasada hacia 1320), y otra banda que sirva de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de la pastilla de bromuro de potasio utilizada.



**Figura 24.** Espectro de absorción en IR de la molécula de Ch nativo.

Está bien documentado en la bibliografía que los valores de % GDA determinados para una misma muestra de Ch son siempre dependientes del método empleado, e incluso puede haber grandes variaciones asociadas a errores sistemáticos que distorsionan los resultados de manera dependiente de

## Resultados y discusión

la técnica utilizada (Baxter y col., 1992 y Balázs y col., 2007). Los resultados obtenidos por titulación potenciométrica fueron contrastados con los % GDA determinados por espectroscopía IR (Tabla 1). Al comparar los valores resultantes de cada técnica, se encontró una gran correspondencia entre los resultados obtenidos por los dos métodos evaluados; de esta manera, no se muestra una desviación sistemática método dependiente en los diferentes valores encontrados de % GDA para Ch nativo de bajo peso molecular. Resultados similares de correlación de % GDA de Ch obtenidos por diferentes metodologías, fueron encontrados por Md Rabiul Hussain, Iman y Maji (2013) y Balázs y Sipos (2007).

**Tabla 1.** Valores comparativos de % GDA según metodología aplicada.

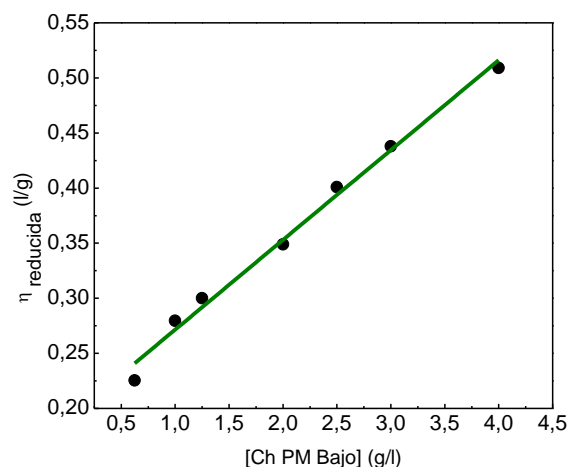
Muestra	% GDA			
	Titulación potenciométrica		Espectroscopía IR	
	% GDA	Desviación Estándar	Área Banda 1320 cm <sup>-1</sup> / Área Banda 1420 cm <sup>-1</sup>	% GDA
Ch PM Bajo	87.82	1.01	60.2 / 79.1	87.88

### IV. 1.2. Determinación del peso molecular (PM)

Es de gran importancia, y en muchos casos, crítico, conocer con precisión y exactitud el valor del PM del Ch, ya que sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y reológicas varían significativamente con el PM y la distribución molecular (Beri y col., 1993; Denuzière y col., 1995). El PM

## Resultados y discusión

fue determinado por dos métodos diferentes (Viscosimetría y SEC). El método viscosimétrico es muy útil en la caracterización de polímeros naturales debido a su sencillez y bajo costo. Utilizando la ecuación de Mark–Houwink–Sakurada (MHKS) se puede determinar la relación entre la viscosidad intrínseca y la masa molecular relativa del polímero (Paz y col., 2013). La representación gráfica de la viscosidad reducida frente a la concentración del Ch se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Viscosidad reducida ( $\eta_{\text{reducida}}$ ) frente a la concentración de Ch.

Los parámetros  $K$  y  $a$  de la ecuación MHKS fueron tomados de Yomota y col., (1993) para un buffer  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,50 M /  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0,50 M. Considerando los valores publicados por estos autores para las constantes de la ecuación MKHS,  $K = 0,119$  y  $a = 0,59$ , se obtuvo un valor de  $\eta_{\text{intrínseca}} =$

## Resultados y discusión

190,00 ml/g, un  $R^2 = 0,9897$  y  $n = 7$ . El peso molecular calculado fue de 270 kDa para Ch nativo de bajo PM.

La cromatografía de exclusión molecular es el método más directo para la caracterización de PM. Esta técnica proporciona el peso molecular promedio en número,  $M_n$ , y el peso molecular promedio en peso,  $M_w$ , y por lo tanto, el índice de polidispersidad,  $M_w/M_n$ , en una sola medición (Nguyen y col., 2009). Las Distribuciones de Masas Molares (DMMs) se obtuvieron combinando los cromatogramas de DR de la muestra con la calibración directa de estándares de Pu. A partir de las DMMs, se obtuvo un valor de  $M_n$  de 80,30 kDa, y  $M_w$  de 297 kDa; resultando una polidispersidad, expresada como  $M_w/M_n$ , de 3,70.

A fin de poder comparar los resultados obtenidos por ambos métodos y validar el método viscosimétrico, se presentan debajo los valores correspondientes al PM del Ch nativo (Tabla 2). Se observa que el resultado encontrado utilizando la técnica de viscosimetría capilar presenta una mínima diferencia (menor al 10%) respecto del obtenido por SEC evidenciando que el método viscosimétrico puede ser empleado como técnica de caracterización del Ch nativo.

**Tabla 2.** Peso molecular de Ch nativo según método viscosimétrico y SEC

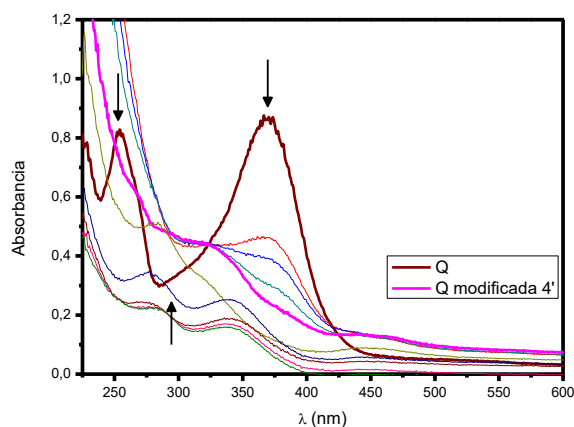
Muestra	Viscosimetría	SEC
	$M_v$ (kDa)	$M_w$ (kDa)
Ch PM Bajo	270	297

## Resultados y discusión

### IV.2. Derivatización del quitosano

#### IV.2.1. Seguimiento de reacción de oxidación de Q con CPO

La Q fue oxidada por la enzima CPO, resultando a un tiempo de 4 min la formación de la característica *o*-quinona (Pourcel y col., 2007). La figura 26 muestra el espectro de absorción de la Q antes y después de la oxidación enzimática.



**Figura 26.** Espectro de absorción de Q que muestra el seguimiento del avance de reacción de su oxidación biológica con enzima CPO en función del tiempo: Q sin modificar (—); Q modificada luego de 4 min de reacción (—)

## Resultados y discusión

---

Como se puede observar las dos bandas características de la Q, a 254 nm y 367 nm, decrecen significativamente luego de la modificación enzimática, y al mismo tiempo aparece una nueva banda de absorción a una  $\lambda$  aproximada de 300 nm, típica de la formación del producto de oxidación. Numerosos autores han informado resultados similares al realizar oxidaciones enzimáticas utilizando peroxidasas (Torres y col., 2012; Momic y col., 2009; Vachoud y col., 2001), tirosinasas (Kumar y col., 1999; Fras-Zemljic y col., 2011; Sousa y col., 2009; Wu y col., 2002; Aberg y col., 2002; Kimura y col., 2012; Demolliens y col., 2008) y lacasas (Bozic y col., 2012, 2013; Aljawish, 2012; Brzonova y col., 2011; Rocasalbas y col., 2013) sobre derivados fenólicos con el fin de obtener quitosano derivatizado con propiedades funcionales mejoradas.

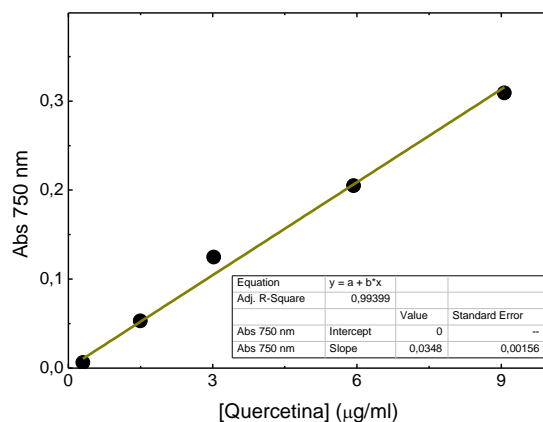
### IV.3 Caracterización química del Ch derivatizado

#### IV.3.1 Cuantificación de polifenoles y eficiencia de reacción de derivatización

El contenido total de polifenoles presentes en la molécula de Ch-Q, fue determinado con el reactivo Folin-Ciocalteu, usando como compuesto estándar la Q. En la figura 27 se grafica la curva de calibración, donde se representan los valores de absorbancia obtenidos en función de la concentración de las soluciones de Q.



## Resultados y discusión



**Figura 27.** Curva de calibración de quercetina. Valores de absorbancia a  $\lambda=750$  nm a diferentes concentraciones del estándar.

La cuantificación de polifenoles se calculó aplicando la ecuación de la recta  $y=0,0348x$ ,  $R^2=0,994$ ; donde  $y$  es la absorbancia a 750 nm y  $x$ , el contenido total de polifenoles en la molécula Ch-Q (equivalente a la concentración de Q presente en la molécula de Ch derivatizado), expresado en  $\mu\text{g/ml}$ . Se determinó, además, la eficiencia de reacción de derivatización expresada en % en función del estándar utilizado. Teniendo en cuenta el valor de absorbancia promedio hallado en la muestra de Ch-Q se obtuvo un valor de  $7,81 \mu\text{g/ml}$  de Q; logrando una eficiencia de reacción del 52 %.

## Resultados y discusión

---

### IV.3.2 Propiedades antioxidantes de la molécula derivatizada

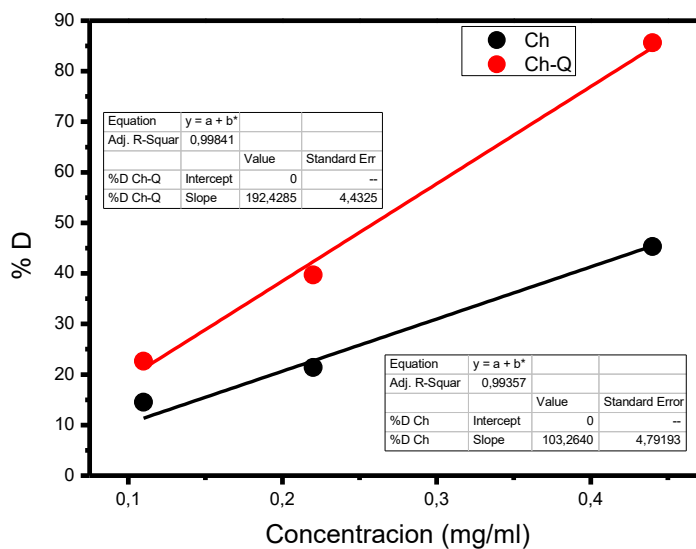
#### IV.3.2.1. Desactivación de $O_2^{\bullet-}$

El anion superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ , es precursor de radicales libres activos que tienen el potencial de reaccionar con macromoléculas biológicas y, por lo tanto, inducir daño en el tejido (Halliwell y col., 1984). El radical  $O_2^{\bullet-}$  también ha sido observado como iniciador directo de la peroxidación lipídica (Wickens, 2001) y desempeña un papel importante en la formación de otras EROS, tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y oxígeno molecular singulete ( $O_2(^1\Delta g)$ ), lo que induce daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN (Pietta, 2000).

El radical  $O_2^{\bullet-}$  es una de las especies oxigénicas reactivas capaz de reaccionar con moléculas que se encuentran alejadas del lugar de origen y susceptibles de atravesar membranas celulares. Si bien carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, puede actuar como oxidante débil o como agente reductor (Hernández y col., 2010), y ser fuente de numerosos perjuicios para el hombre como para los alimentos ya que presenta una continua degradación de sus nutrientes (Valko y col., 2007).

En la figura 28, se grafican los %D del radical  $O_2^{\bullet-}$  en función de las diferentes concentraciones. En tanto, que en la tabla 3 se presentan los %D del radical  $O_2^{\bullet-}$  para la molécula de Ch y Ch-Q, a las tres concentraciones evaluadas, y las diferencias de desactivación encontradas entre ambas moléculas.

## Resultados y discusión



**Figura 28.** % Desactivación comparativa (%) entre molécula de Ch y Ch-Q, frente a  $O_2^{\bullet-}$  en función de las concentraciones evaluadas (0,11, 0,22 y 0,44 mg/ml).

**Tabla 3.** Porcentajes de desactivación (%D) de radical  $O_2^{\bullet-}$  por Ch nativo y Ch derivatizado (Ch-Q).

Concentración (mg/ml)	% D $O_2^{\bullet-}$		Diferencia (%)
	Ch	Ch-Q	
<b>0,11</b>	14,50	22,63	8,13
<b>0,22</b>	21,38	39,70	18,32
<b>0,44</b>	45,32	85,62	40,3

## Resultados y discusión

---

Se observa que el %D frente a  $O_2^{\cdot-}$  depende de la concentración de antioxidante evaluada. Para concentraciones entre 0,11 mg/ml y 0,44 mg/ml, se obtiene para la molécula de Ch un %D de  $O_2^{\cdot-}$  entre 14,50% y 45,32%, y para la molécula de Ch-Q un %D de  $O_2^{\cdot-}$  entre 22,63% y 84,62%. El Ch derivatizado con Q presentó un %D de  $O_2^{\cdot-}$  aproximadamente 2 veces mayor que el valor obtenido para la misma concentración de Ch nativo, siendo más evidente a concentraciones mayores.

### IV.3.2.2. Desactivación de $\cdot OH$

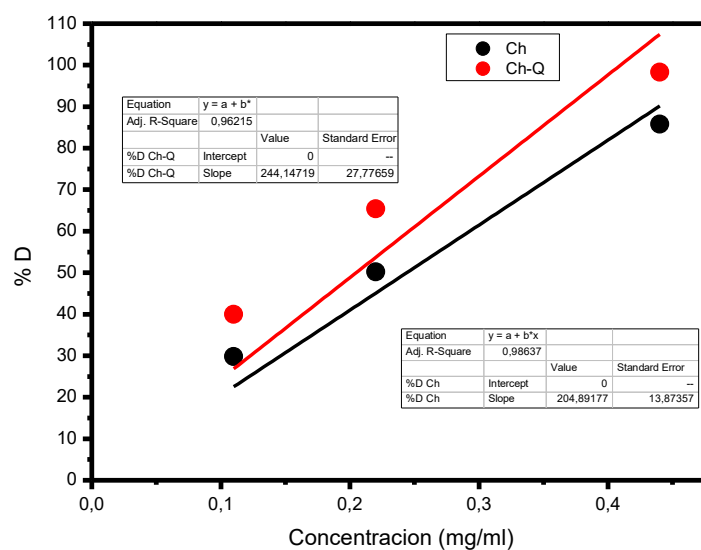
El radical  $\cdot OH$  es uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza (Halliwell y col., 1984). De vida extremadamente corta y alta reactividad, su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula, ADN, proteínas o enzimas. Además, es el responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares, ya que puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena (Hernández y col., 2010).

En la tabla 4 se presentan los %D del radical  $\cdot OH$  para la molécula de Ch y Ch-Q, a las tres concentraciones evaluadas, y las diferencias de desactivación encontradas entre ambas moléculas. En tanto, que en la Figura 29, se grafican los %D del radical  $\cdot OH$  en función de las diferentes concentraciones.

## Resultados y discusión

**Tabla 4.** Porcentajes de desactivación (%D) de radical  $\cdot\text{OH}$  por Ch nativo y Ch derivatizado (Ch-Q).

Concentración (mg/ml)	% D $\cdot\text{OH}$		Diferencia (%)
	Ch	Ch-Q	
0,11	29,78	39,98	10,2
0,22	50,20	69,40	19,2
0,44	85,78	98,30	12,52



**Figura 29.** % Desactivación comparativa (%) entre molécula de Ch y Ch-Q, frente a  $\cdot\text{OH}$  en función de las concentraciones evaluadas (0,11, 0,22 y 0,44 mg/ml)

## Resultados y discusión

---

El %D frente al radical  $\cdot\text{OH}$ , al igual que los demás radicales, es dependiente de la concentración de antioxidante evaluado. Para las concentraciones analizadas, la molécula de Ch presentó un %D de  $\cdot\text{OH}$  entre 29,78% y 85,78%, mientras que la molécula de Ch-Q presentó un %D entre 39,98% y 98,30%. Se observa en la tabla 4, que frente al radical  $\cdot\text{OH}$ , la molécula de Ch-Q presenta un mayor %D que la molécula de Ch nativo.

En cuanto a la reactividad de las dos moléculas frente al radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{OH}$ , el Ch-Q es más eficiente desactivante para ambas especies que la molécula de Ch nativo, presentando un poder antioxidante similar para ambas especies a concentraciones de 0,11 y 0,22 mg/ml, mientras que a 0,44 mg/ml Ch-Q presentó un mayor poder antioxidante frente al radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Con la unión de la Q en la molécula de Ch, las propiedades antioxidantes han sido mejoradas en comparación con el Ch nativo.

Según Kim y Thomas (2007) la presencia de los grupos  $-\text{NH}_2$  está intrínsecamente ligada a la actividad antioxidante del Ch, la disponibilidad de un par de electrones libres en este grupo funcional da lugar a la captación de protones  $\text{H}^+$  desde el medio, los mismos posteriormente serán cedidos a los radicales libres que forman parte de la cadena de reacciones que constituyen la degradación oxidativa, formando moléculas más estables y evitando la concreción de dicho fenómeno.

Las propiedades antirradicalarias de los flavonoides se dirigen fundamentalmente hacia los radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{OH}$ , especies altamente

## Resultados y discusión

---

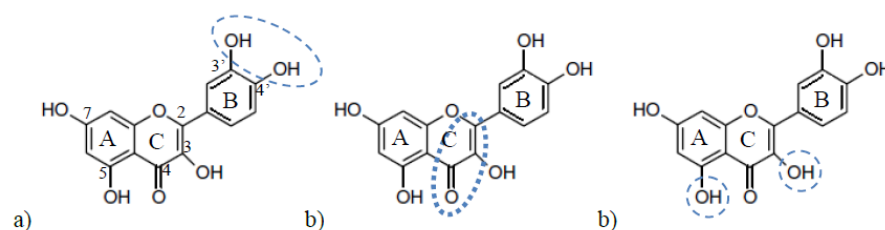
reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica (Jovanovic y col., 1998).

Se ha reportado en la bibliografía que la propiedad antioxidante de algunos flavonoides es principalmente efectiva debido a que actúan como agentes secuestrantes de los radicales  $O_2^{\bullet-}$  (Yen y col., 1994). Sousa, Guebitz y Kokol (2009) demostraron que el incremento en el porcentaje de inhibición durante la generación del  $O_2^{\bullet-}$  fue debido a la funcionalización del quitosano con diversos flavonoides como quercetina, hesperidina, catequina, epicatequina, fisetina, etc.

El aumento del potencial antioxidante mostrado por el biopolímero modificado podría explicarse en términos de algunos aspectos estructurales otorgados por la Q oxidada (Torres y col., 2012). Las características de la estructura química que le conceden a los flavonoides actividad para actuar contra las EROS, son: a) la estructura *o*-dihidroxi (o grupo catecol) en el anillo B el cual es oxidado a potenciales muy bajos (Dugas y col., 2000; Oliveira y col., 2003), b) el doble enlace C2-C3 en conjunto con la función 4-oxo en el anillo C, y c) la presencia de 3-, 5-OH en los anillos C y A necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Dugas y col., 2000). En la figura 30, se representa la estructura química del flavonoide indicando los grupos importantes para una efectiva capacidad antioxidante.

## Resultados y discusión

---



**Figura 30.** Grupos importantes para una efectiva actividad en los flavonoides contra las EROS. a) grupo catecol, b) grupo 4-oxo en anillo C y doble enlace C2-C3, c) 3-, 5-OH en anillo C y A (*Janeiro y col., 2005*)

El grupo catecol en el anillo B se oxida a potenciales positivos muy bajos, es decir tiene una gran facilidad para ceder sus electrones. La capacidad antioxidante de este grupo se ve reforzada por la presencia de un doble enlace C2-C3 en combinación con el grupo OH del C3. Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante (*Martínez-Flórez y col., 2002*). Estas características estructurales de la Q han sido reportadas como determinantes para su actividad antioxidante (*Ji y col., 2005; Fiorucci y col., 2007*).



## Resultados y discusión

---

### IV.4. Caracterización del film biodegradable

#### IV.4.1. Propiedades físico-químicas y propiedades barrera

##### IV.4.1.1. Medida del espesor y densidad, y permeabilidad al O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y vapor de agua

###### *Propiedades físicas*

El espesor del film es un parámetro muy importante en la determinación de las propiedades físicas de los recubrimientos alimenticios ya que afecta directamente la funcionalidad de las películas, no sólo las propiedades ópticas, como ser la transparencia y opacidad, sino también las propiedades de barrera ya que si se supera un espesor crítico puede causar efectos perjudiciales reduciendo la concentración interna de O<sub>2</sub> y aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> favoreciendo la fermentación anaeróbica (Lin y col., 2007). El espesor obtenido depende de las propiedades de la solución formadora de film, tales como la densidad, viscosidad y tensión superficial, así como de la velocidad de escurrido de la solución de la superficie del alimento y la velocidad de secado (Cisneros-Zevallos y col., 2003).

Los valores promedios de espesor obtenidos para los films a base de Ch y Ch-Q se presentan en la tabla 5. Se observa que el espesor encontrado para los films a base de Ch fue  $62,48 \pm 2,40 \mu\text{m}$ ; mientras que, para los films a base de Ch derivatizado el valor fue mayor, viéndose afectado por la

## Resultados y discusión

incorporación de Q, llegando a un valor promedio de  $90,80 \pm 3,00 \mu\text{m}$ . Resultados similares fueron encontrados por Benavides, Villalobos-Carvajal, y Reyes (2012) quienes informaron que la adición de aceite esencial de orégano (1,5%) en la emulsión formadora de película condujo a un aumento en el espesor.

**Tabla 5.** Efecto de la derivatización de Ch nativo con Q sobre el espesor, densidad y propiedades barrera del film.

Propiedades	Resultados	
	Ch	Ch-Q
Espesor ( $\mu\text{m}$ )	$62,48 \pm 2,40$	$90,80 \pm 3,00$
Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$1,46 \pm 0,03$	$1,56 \pm 0,06$
Permeabilidad al Vapor de Agua, WVP ( $\text{g}/\text{m s Pa}$ )	$7,37 \times 10^{-11}$	$6,77 \times 10^{-11}$
Permeabilidad al O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> P ( $\text{cm}^3/\text{m}^2 \text{ día atm}$ )	2	1,6
Permeabilidad al CO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> P ( $\text{cm}^3/\text{m}^2 \text{ día atm}$ )	26	21

La densidad de la película seca puede variar según el tipo de material del recubrimiento que se utiliza y tiene un efecto directo sobre el espesor de la misma (Cisneros-Zevallos y col., 2003).

Los resultados, muestran un aumento en el espesor y la densidad del film a base de Ch-Q. La compactación de la estructura del film asociada con la presencia de las moléculas del flavonoide entre las moléculas de Ch podría incrementar la densidad de los films obtenidos. Park y Zhao (2004)

## Resultados y discusión

---

reportaron resultados similares de aumento de densidad del film con el agregado de una mezcla de lactato de calcio y gluconato, y lactato de Zinc a la molécula de Ch.

Los resultados presentados en la tabla 5 muestran que la derivatización del Ch con Q tuvo un efecto apreciable sobre la densidad del film. La misma aumentó de  $1,46 \pm 0,03$  a  $1,56 \pm 0,06$  g/cm<sup>3</sup>. Por lo tanto, un aumento de las interacciones intermoleculares dentro de la cadena polimérica de quitosano, debido a la presencia de Q, provocó un incremento en la densidad de la película. Siripatrawan y Harte (2010) encontraron que la adición de extracto de té verde a films de quitosano resultaron en un film más denso debido a las interacciones puente hidrógeno y covalentes entre la red de quitosano y los compuestos fenólicos. Esto fue previamente demostrado por Rohn y col. (2004), quienes postulan que existe la posibilidad de que los compuestos fenólicos sean capaces de fijarse en la matriz de Ch y establecer interacciones como enlaces hidrogeno y covalentes con los grupos reactivos del Ch. Por lo tanto, al aumentar la interacción intermolecular con la cadena polimérica del Ch, la densidad del film Ch-Q aumenta. Curcio y col. (2009) también observaron la formación de enlaces covalentes entre el antioxidante ácido gálico (fenólico) y el Ch según verificaron por FTIR. Gómez-Guillén y col. (2007) también reportaron una disminución en la disponibilidad de los grupos hidrógenos debido al entrecruzamiento entre la gelatina de atún y los extractos antioxidantes a partir de hojas de murta.

## Resultados y discusión

---

### *Propiedades barrera*

La determinación de las propiedades barrera de un polímero es crucial para estimar y predecir la vida útil del producto-envase. Los requisitos de barrera son específicos de cada sistema y están relacionados con las características del producto y la aplicación de uso final previsto (Kanatt y col., 2012). Las propiedades de barrera están estrictamente correlacionadas con la estructura del polímero, tales como el grado de cristalinidad, la relación entre la fase amorfa y cristalina, la naturaleza polimérica, el tratamiento térmico y mecánico antes y después del contacto con los alimentos, los grupos químicos presentes en el polímero (polar o no polar), el grado de entrecruzamiento y la temperatura de transición vítrea (Siracusa, 2012). Además, la composición intrínseca del alimento envasado (por ejemplo, pH, contenido de grasa, aromas) y los factores ambientales, como la temperatura y la humedad relativa, pueden tener influencia en las características de adsorción del material afectando sus propiedades barrera (Johansson y col., 1995).

Se define WVP como la cantidad de vapor de agua que pasa por unidad de superficie de un material de espesor unidad por unidad de tiempo cuando entre sus paredes existe una diferencia de presión unitaria, bajo condiciones especificadas de temperatura y humedad. (ASTM E 96-95).

La WVP es una de las características más estudiadas de los films biodegradables, principalmente debido a la importancia del agua en las

## Resultados y discusión

---

reacciones de deterioro en los alimentos. Un gran número de factores pueden afectar la WVP de las películas como por ejemplo, el espesor del film, la afinidad por el agua y la cristalinidad (Martins y col., 2012). Dado que una de las funciones principales del envase de un alimento es evitar o disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y la atmósfera circundante, WVP debe ser tan baja como sea posible (Gontard y col., 1992). Las interacciones entre las moléculas del polímero y de agua son fundamentales para evaluar la permeación del agua a través de una película, que por lo general se produce a través de la parte hidrofílica de la misma (Sangaj y col., 2004). La relación entre las fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas también es un factor importante en la determinación de WVP (Bourbon y col., 2011).

El efecto de la adición de Q provocó un aumento en las fuerzas de cohesión de la red de quitosano (como se observa también en los resultados de las propiedades mecánicas), conduciendo a una disminución en los valores de WVP ( $7,37 \times 10^{-11}$  para los films de Ch y  $6,77 \times 10^{-11}$  para los films de Ch-Q), afectando el comportamiento hidrofílico e hidrofóbico del film a base de Ch y originando películas más cristalinas. La estructura polimérica más compacta generada por la presencia de Q, facilita la formación de enlaces hidrógeno con el Ch y por consiguiente favorece la formación de una película con mayor cristalinidad. Está ampliamente demostrado que los polímeros con alta cristalinidad generalmente son menos permeables debido a su estructura ordenada, y que la transferencia de masa de un gas en un polímero semi-cristalino es fundamentalmente una función de la fase amorfa (Sperling,

## Resultados y discusión

---

2006). El trabajo de Miller y Krochta (1997) también señala el hecho de que la permeabilidad se ve afectada por lo estrecho del empaquetado de las cadenas poliméricas, estableciendo así una relación directa entre la cristalinidad y la permeabilidad. Byun, Kim y Whiteside (2010) informaron que la adición de  $\alpha$ -tocoferol a las películas de ácido poli-láctico (PLA) mejoró las propiedades de barrera al vapor de agua. Resultados similares fueron observados por Ziani y col. (2008) para las películas de Ch, donde el incremento de cristalinidad condujo a una disminución de WVP. Resultados similares fueron observados por Park y Zhao (2004) en un estudio sobre la incorporación de minerales y vitaminas en films a base de Ch. Encontraron que la adición de minerales o vitaminas en la matriz del film, aumentó la interacción entre estructuras moleculares adyacentes, resultando en una disminución en la difusión del vapor de agua a través de la red polimérica del film y una disminución en la tendencia hidrofílica de los films. Además, Talja y col. (2007) demostraron que la interacción por enlaces hidrógeno entre Ch y almidón, redujeron los sitios de sorción libres para el agua, siendo responsable de la disminución de WVP de la película. Siripatrawan y Harte (2010) no sólo encontraron que la adición de extracto de té verde provocó un aumento en la densidad de los films, sino también obtuvieron un film con menor WVP debido a las interacciones hidrógeno y covalentes entre la red de quitosano y los compuestos fenólicos.

Como se mencionó anteriormente la permeabilidad que presenta un film, depende de varios factores, entre ellos las características del polímero

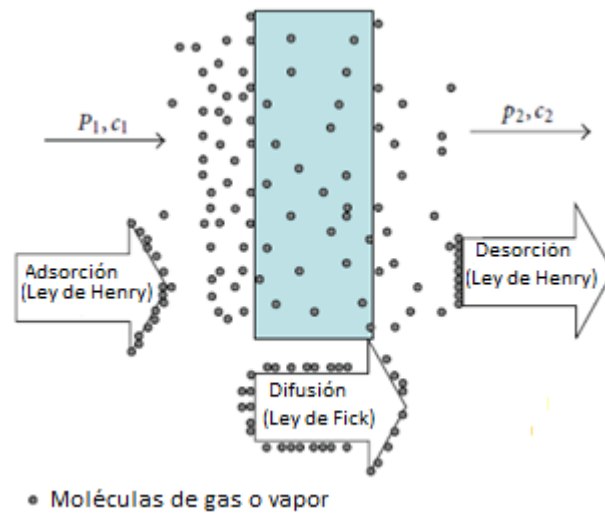
## Resultados y discusión

---

utilizado para su formación. Al contar con un Ch de mayor % GDA, favorecemos la formación de una estructura más compacta. El Ch con un mayor grado de desacetilación contiene más grupos glucosamina, que facilitan la formación de enlaces hidrógeno, logrando una estructura más compacta, y como consecuencia favoreciendo la formación de zonas cristalinas en el film (Bangyekan y col., 2006).

Cuando el material de la película no presenta defectos o fallas como poros, grietas o roturas, el principal mecanismo de flujo del gas o vapor de agua se rige por el modelo de difusión; esto significa que el permeato se disuelve del lado de la película de mayor concentración, difunde a través de la película, impulsado por un gradiente de concentración, y se evapora del otro lado (Siracusa, 2012). Considerando esta teoría, la permeación de gas a través de un polímero se describe utilizando las leyes de Henry y Fick que relaciona la velocidad de permeación con el área y el espesor de la película (Lee y col., 2008). Resultando la permeabilidad igual al producto del coeficiente de difusión ( $D$ ) por el coeficiente de solubilidad ( $S$ ); siendo ambos coeficientes independientes de la concentración del permeato (Cuq, 1996). El mecanismo se describe de una manera muy simple, en la figura 31, para una película de polímero homogénea con un espesor  $l$ , una presión de permeato  $p$  (con  $p_1 > p_2$ ) y una concentración de permeato  $c$  (con  $c_1 > c_2$ ).

## Resultados y discusión



**Figura 31.** Mecanismo general de permeación de un gas o vapor de agua a través de un film plástico (*Siracusa, 2012*)

Obviamente en la práctica, esta hipótesis no es válida. Para la mayoría de las películas a base de biopolímeros se producen interacciones entre el permeato y la película, y  $D$  y  $S$  dependen del diferencial de presiones parciales (Cuq, 1996).

Según los resultados obtenidos para permeabilidad del film de Ch-Q (tabla 5), el vapor de agua interaccionaría con los grupos OH libres de la Q y el Ch, encontrándose un comportamiento que no sigue la ley de Fick, y provocando una disminución en WVP. Robertson (2006) también reportó que en la realidad se pueden producir interacciones entre el agua y la porción hidrofílica del film indicando un comportamiento alejado de la ley de Fick.



## Resultados y discusión

---

En las películas que no se comportan idealmente, la difusión del permeato a través de la misma está influenciada por su estructura, la permeabilidad de la misma a vapores o gases específicos, su espesor, el área, la temperatura, la diferencia de presión o gradiente de concentración a través de la película. (Park y col., 1990; Siracusa, 2012; McHugh y col., 1993).

Según lo referido anteriormente, el espesor promedio de los films a base de Ch-Q, fue mayor que para las películas a base de Ch, ejerciendo también influencia sobre la disminución de WVP. Está demostrado que un aumento del espesor de la película implica una disminución lineal en la permeancia del vapor de agua (McHugh y col., 1993; Park y col., 1993). Una de las hipótesis para explicar el efecto del espesor de los films sobre las propiedades barrera al vapor de agua planteadas por Banker, Gore y Swarbrick (1966) sería que el hinchamiento de la red macromolecular podría ocurrir debido a la sorción del agua durante la transferencia de ésta, y que este hinchamiento se produciría en el lado de la película en contacto con la alta humedad atmosférica y afectaría sólo a una parte delgada de la misma; por lo tanto, la proporción de tal hinchamiento podría ser menor cuanto más gruesa sea la película (Cuq y col., 1996). Gontard y col. (1994) también formularon que el efecto de sorción de las moléculas de agua por la fracción polar del material de película podría afectar la WVP.

La permeabilidad a los gases del material de envasado es de gran importancia para la conservación de alimentos. La medición de la permeabilidad al oxígeno ( $O_2P$ ) y al dióxido de carbono ( $CO_2P$ ) de las

## Resultados y discusión

---

películas comestibles proporciona información importante para su futuro desarrollo. Al igual que lo mencionado para el vapor de agua, la permeabilidad a los gases de películas y recubrimientos comestibles depende de varios factores tales como la integridad de la película, el espesor, la relación entre las zonas cristalinas y amorfas, la relación hidrofílica-hidrófoba y la movilidad de la cadena polimérica; la interacción entre el polímero formador de película y la presencia de un plastificante o de otros aditivos son también factores importantes en la permeabilidad de la película (García y col., 2000).

El oxígeno es otro de los principales permeatos estudiados en envases para alimentos, ya que se puede transferir hacia o desde el interior a través de la pared del envase polimérico, resultando en un cambio continuo de la calidad del producto (Kanatt y col., 2012). El oxígeno es el factor clave que puede causar la oxidación de lípidos, el crecimiento de microorganismos, el pardeamiento enzimático y la pérdida de proteínas y vitaminas (Ayranci y col., 2003), induciendo cambios no deseados afectando el olor, color y sabor, y deteriorando las propiedades organolépticas del alimento. Sin embargo, algo de oxígeno disponible es necesario para la respiración de los tejidos vivos (Oms-Oliu y col., 2008; Rojas-Grau y col., 2007). Por lo tanto, las películas que proporcionan una adecuada barrera al oxígeno pueden ayudar a mejorar la calidad de los alimentos y prolongar su vida útil (Sothornvit y col., 2007). El efecto nocivo del oxígeno en los alimentos es comúnmente retrasado con la aplicación de agentes antioxidantes que prevengan el

## Resultados y discusión

---

pardeamiento, o bien, mediante la selección de películas y recubrimientos con limitada O<sub>2</sub>P (Bonilla y col., 2012). Por otra parte, Xu y col. (2005) informaron que las películas a base de Ch poseían baja permeabilidad al oxígeno. Según Kester y Fennema (1986) y Yang y Paulson (2000), las películas y recubrimientos a base de polisacáridos o proteínas generalmente proporcionan una buena barrera a la transferencia de oxígeno debido a la formación de una red fuertemente empaquetada y ordenada.

Los valores obtenidos para los films de Ch-Q mostraron que la O<sub>2</sub>P resultó ser algo menor que para los films a base de Ch (tabla 5), observándose un valor de 1,6 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> día atm frente a 2 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> día atm, respectivamente. Al igual que lo descrito para la WVP, el Ch, al formar enlaces hidrógeno con la Q, limitaría la movilidad intermolecular y disminuiría su volumen libre, contribuyendo a la disminución de O<sub>2</sub>P. Esta característica que presentan las películas a base de Ch se ha utilizado ampliamente en el envasado en atmósfera modificada de frutas y hortalizas (Tharanathan y col., 2002). Varias investigaciones han mostrado que la incorporación de antioxidantes en la formulación del film puede funcionar como una barrera al O<sub>2</sub>, lo cual resulta en un aumento en la preservación de la calidad del producto alimenticio (Bonilla y col., 2012). El aumento en el número de grupos OH debido a la presencia de Q en la matriz polimérica, aumentaría la densidad de energía cohesiva. Las fuerzas de interacción se relacionan directamente con la densidad de energía cohesiva, siendo una medida de la polaridad de un polímero y de la energía de la unión de las

## Resultados y discusión

---

cadena. En general, cuanto mayor sea la densidad de energía cohesiva de un polímero, más difícil es abrirse y permitir el paso de un determinado permeato (Cerqueira y col., 2012). También Bifani y col. (2007) reportaron resultados similares obteniendo una disminución en la  $O_2P$  a mayor concentración de flavonoides, entre ellos quercetina, en films a base de carboximetilcelulosa.

Al igual que las propiedades barrera frente al oxígeno y al vapor de agua, evaluar  $CO_2P$  es de particular interés en el envasado de alimentos. El dióxido de carbono que se forma en algunos alimentos envasados por reacciones de deterioro y respiración debe ser retirado del interior del envase para evitar una mayor pérdida del alimento y/o destrucción del material (Vermeiren y col., 2003). Por ejemplo, para los productos frescos como frutas cortadas, papas y hortalizas listas para el consumo, la tasa respiratoria es un factor de una gran importancia en el diseño del envase, con lo cual identificar un adecuado material de envasado y la mejor tecnología para su fabricación, es un factor crucial (Siracusa, 2012).

Se observó que la adición de Q, provocó una disminución de  $CO_2P$  respecto de los films a base de Ch nativo. (Tabla 5). La baja difusividad del  $CO_2$  a través del film Ch-Q podría ser explicada por la distribución de las moléculas del flavonoide en la matriz del Ch que causaría una disminución en la porosidad y por ende una disminución en  $CO_2P$ . Resultados similares fueron obtenidos cuando se incorporó proteína de suero de leche a los films de Ch, cuando se trabajó con un bajo contenido de proteína se logró

## Resultados y discusión

---

disminuir la  $\text{CO}_2\text{P}$ , comparado con films de Ch sin proteína (Di Pierro y col., 2006). Cerqueira y col. (2012) también encontraron que  $\text{CO}_2\text{P}$  disminuyó cuando incrementaron el contenido de plastificante, para concentraciones de Ch menores a 1,5% p/v.

En nuestro caso, la interacción entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  del Ch y la quinona de la Q, provocó una disminución en la permeabilidad a los gases en comparación con el film de Ch nativo. Esta nueva red polimérica formada resultaría en una película con una estructura compacta, más estrecha y de menor permeabilidad.

También es posible observar en la tabla 5 que el aumento en el espesor del film de Ch-Q provocó una influencia positiva sobre las propiedades barrera del film, disminuyendo la permeabilidad del  $\text{CO}_2$  y el  $\text{O}_2$ . La distancia que ambos gases tienen que recorrer para su difusión a través de la película, es mayor, y de esta manera, reduce la permeabilidad o se aumenta la resistencia de los recubrimientos a la difusión de los gases. Mediciones de gases internos mostraron que las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono varían de acuerdo con el espesor de la película; de esta manera, existiría la posibilidad de modificar los gases internos mediante el control de las propiedades de la solución de revestimiento (Cisneros-Zevallos y col., 2003).

Por otra parte, la tabla 5 muestra que los valores de  $\text{O}_2\text{P}$  tanto de los films de Ch como de Ch-Q resultaron ser más bajos que los valores de  $\text{CO}_2\text{P}$ , lo que indica una acción selectiva de estas películas sobre la permeabilidad

## Resultados y discusión

---

de ambos gases, presentando el O<sub>2</sub> una difusión y solubilidad más baja en estas películas. Esto normalmente se atribuye a la diferente solubilidad de estos gases en agua; el CO<sub>2</sub> es aproximadamente 35 veces más soluble que el O<sub>2</sub>, dando lugar a una más rápida difusión, aumentando su permeabilidad (Mujica-Paz y col., 1997). Cuando estas películas se aplican a frutas que se almacenan en ambientes de alta humedad relativa, limitan más la entrada de O<sub>2</sub> al fruto que la salida de CO<sub>2</sub> lo que permite restringir la respiración del fruto evitando la anaerobiosis y el desarrollo de malos sabores (Baldwin, 1994).

Para realizar un comparativo entre valores de permeabilidad para diferentes polímeros es necesario tener en cuenta las condiciones en que se realiza el ensayo, ya que al variar las mismas, se ve afectada la permeabilidad. Por ejemplo: la O<sub>2</sub>P de materiales comestibles depende de muchos factores, entre ellos, la temperatura y humedad relativa. Maté y Krochta (1998) realizaron mediciones de la O<sub>2</sub>P de películas a base de proteína de suero y β-lactoglobulina plastificadas con glicerol, y observaron que la temperatura alta promovía la transferencia de gas a través del film de una manera exponencial. La O<sub>2</sub>P es altamente dependiente de la humedad relativa (Hong y col., 2006).

A medida que la humedad relativa aumenta, más moléculas de agua interactúan con el material y la película se vuelve más plástica. En estas condiciones, la movilidad y la excesiva transferencia de masa a través de la película se ven favorecidas. Si analizamos el caso en que las películas se

## Resultados y discusión

---

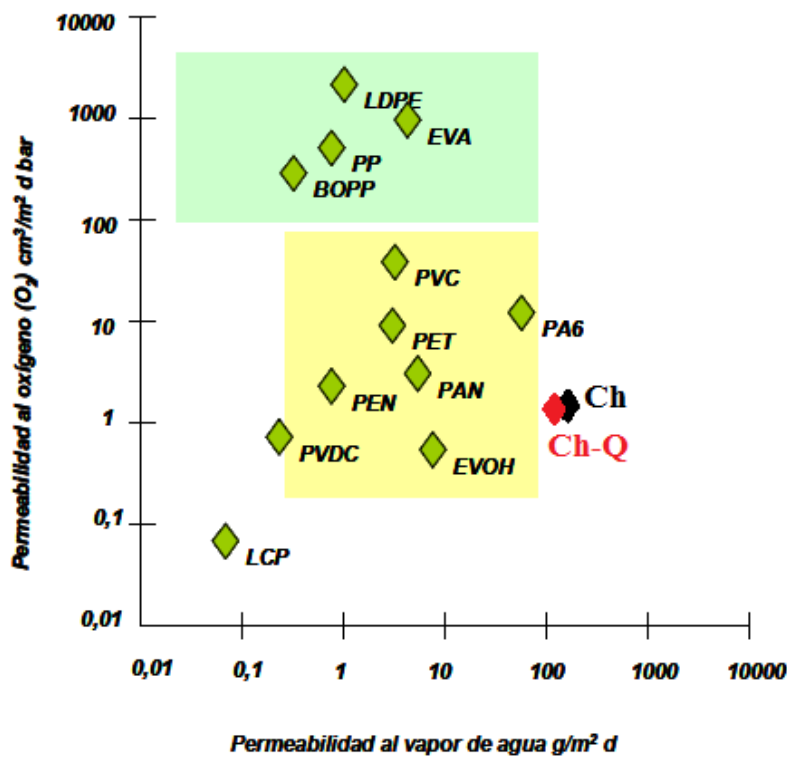
emplearan en vegetales que debieran almacenarse a 90-95% de HR, la WVP aumentaría debido a que la diferencia de presión parcial de vapor de agua entre los dos lados del film a una determinada temperatura, disminuye afectando el valor de permeabilidad (Ec. 21). También se obtendría una mayor permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> relacionado con un mayor contenido de humedad, hay una modificación en las características de adsorción del material, se genera una mayor movilidad intermolecular y volumen libre, y se incrementan las zonas amorfas, permitiendo de esta manera una mayor transferencia de gas. Respecto de las propiedades mecánicas, obtendríamos un film más plástico y quebradizo, con una estructura más débil, menos compacto, resultando en un menor valor de TS. El mayor contenido de agua contenida en la matriz actuaría como plastificante, con lo cual tendríamos un aumento en la elasticidad (mayor valor de E).

Los resultados encontrados respecto de WVP del film a base de Ch, concuerdan con los valores presentados por otros autores para films a base de Ch, encontrándose dentro del rango de  $2,50 \times 10^{-9}$  g/m s Pa (Casariego y col., 2009) a  $3,03 \times 10^{-12}$  g/m s Pa (Siripatrawan y col., 2010).

En la figura 32 se presentan los valores de WVP y O<sub>2</sub>P de polímeros sintéticos comparativamente con los resultados encontrados para los films de Ch y Ch-Q. En la misma se distinguen claramente dos zonas donde se encuentran, por un lado (zona de color verde), las matrices poliméricas que ofrecen una muy buena barrera al vapor de agua, pero bajas propiedades barrera frente a los gases, entre ellos se puede mencionar el LDPE, PP,

## Resultados y discusión

EVA). Mientras que, por otro (zona de color amarillo), se encuentran los envases de PVC, PET, EVOH, PVDC, que presentan buena  $O_2P$ , y la WVP puede variar desde 0,1 a 100  $g/m^2$  día.



**Figura 32.** Permeabilidad al vapor de agua y al  $O_2$  para diferentes polímeros sintéticos (espesor del material: 100  $\mu m$ , temperatura: 23°C) y el film a base de Ch y Ch-Q. LDPE: polietileno de baja densidad, EVA: etilvinilacetato, PP: polipropileno, BOPP: polipropileno biorientado, PVC: cloruro de



## Resultados y discusión

---

polivinilo, PET: tereftalato de polietileno, PA6: poliamida, PEN: naftalato de polietileno, PAN: poliacrilonitrilo, PVDC: cloruro de polivinilideno, EVOH: etilen-vinil alcohol, LCP: polímero de cristal líquido. (adaptado de *Láminas para el envasado. Guía Técnica. Pentafood*)

Si analizamos específicamente los resultados de permeabilidad encontrados para los films de Ch y Ch-Q respecto de los valores presentados por los polímeros sintéticos, es posible observar que los primeros ofrecen una muy buena barrera a la transmisión de gases, pudiéndolos comparar con el PVDC y el PEN, e inclusive obteniéndose menores valores que el PVC, PET y PA6. Sin embargo, la barrera al vapor de agua que presentan los films de Ch y Ch-Q no es suficiente como para evitar que el producto transmita humedad hacia afuera del envase y se seque.

Una reducción de la WVP y O<sub>2</sub>P posee interés tecnológico ya que se lograría minimizar las pérdidas de humedad del alimento, reducir la pérdida de peso y evitar que se modifique la apariencia y textura del producto alimenticio.

Hay que tener en cuenta que al realizar este análisis comparativo, el espesor de los films formulados a base de Ch y Ch-Q difieren en un 38% y 10%, respectivamente, respecto del que presentan los polímeros sintéticos mostrados en la figura 32; con lo cual las propiedades barreras se verían algo modificadas.

## Resultados y discusión

---

### IV.4.2. Propiedades ópticas

Los valores promedios de espesor fueron utilizados para realizar el cálculo de transparencia y opacidad de acuerdo a las ecuaciones antes presentadas (ec. 17 y ec. 18). Como se observa en la tabla 6, los films de Ch-Q resultaron ser menos transparentes que aquellos formulados a base de Ch nativo; al mismo tiempo, presentaron una mayor opacidad.

**Tabla 6.** Efecto de la derivatización de Ch nativo con Q sobre las propiedades ópticas del film

Propiedades	Resultados	
	Ch	Ch-Q
<b>Opacidad</b>	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,04
<b>Transparencia</b>	1,18 ± 0,05	0,97 ± 0,05

Este incremento en la opacidad del film Ch-Q podría ser debido a que la fuerte interacción entre el Ch y la Q originaría una matriz con una red polimérica más fuerte que la formada por el Ch sin modificar, resultando en valores más altos de opacidad (Cerqueira y col., 2012). La transparencia de un film es una característica deseable desde el punto de vista del consumidor ya que el mismo necesita ver con claridad la apariencia del producto (Jutaporn y col., 2011) Sin embargo, hay que tener presente que contar con

## Resultados y discusión

---

un recubrimiento que tenga una menor transparencia podría ser considerado como un elemento fotoprotector, funcionando como barrera frente a la luz. La opacidad que presenta un material es una indicación de la cantidad de luz que pasa a través de él. Cuanto mayor es la opacidad, menor es la cantidad de luz que puede atravesar el material (Souza y col., 2009), siendo una propiedad relevante dado que tiene un impacto directo sobre la apariencia del producto recubierto (Carneiro-da-Cunha y col., 2009). La presencia de Q en la red polimérica mejoró las propiedades barrera frente a la luz visible, originando un film que lograría prevenir la fotooxidación de lípidos, proteínas, vitaminas y pigmentos cuando es aplicado en un producto alimenticio. Los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos previos de Gómez-Guillén y col. (2007), quienes informaron que había una mejora en las propiedades barrera frente a la luz cuando se añadía extracto antioxidante de murta a películas comestibles a base de gelatina. Park y Zhao (2004) obtuvieron un significativo aumento de la opacidad debido a la incorporación de vitamina E en una matriz de Ch. Un incremento en la opacidad del film como consecuencia de la adición de antioxidantes también ha sido reportado en películas de gelatina de pescado con extracto de borraja (Gómez-Estaca y col., 2009). Resultados encontrados por Martins, Cerqueira y Vicente (2012) demostraron que la adición de  $\alpha$ -tocoferol disminuyó la transparencia de los films a base de Ch, aumentando su opacidad.

## Resultados y discusión

---

### IV.4.3. Contenido de humedad y solubilidad en agua

La afinidad con el agua es uno de los principales problemas de las películas a base de polisacáridos, y es evaluada por diferentes métodos tales como el contenido de humedad, la actividad de agua y de sorción, solubilidad y ángulo de contacto (Fabra y col., 2010, Sánchez-González y col., 2009). La solubilidad en agua de las películas también puede proporcionar información sobre el comportamiento de un film en un entorno acuoso y es una medida de su resistencia al agua, factor importante para determinar la biodegradabilidad de las películas cuando se usan como materiales de envasado (Gnanasambadam y col., 1997).

La solubilidad en agua se define como el porcentaje máximo (por peso) de una sustancia que se disolverá en una unidad de volumen de agua a una determinada temperatura (por lo general temperatura ambiente) (Souza y col., 2009). La necesidad de contar con un film que presente baja o alta solubilidad en agua depende del tipo de alimento que se quiere recubrir. Películas con baja solubilidad en agua son necesarios para la protección de los productos alimenticios, con actividad de agua alta o intermedia (Sébastien y col., 2006). Por otra parte, películas comestibles con alta solubilidad en agua puede ser necesario, por ejemplo, para contener porciones de alimentos que directamente se disuelven en agua o en la comida caliente (Guilbert y col., 1989).

## Resultados y discusión

---

Los resultados presentados en la tabla 7 muestran que los films a base de Ch-Q presentaron un aumento en el contenido de humedad y solubilidad en agua respecto de los films a base de Ch nativo.

**Tabla 7.** Efecto de la derivatización de Ch nativo con Q sobre el contenido de humedad y solubilidad en agua del film

Propiedades	Resultados	
	Ch	Ch-Q
<b>Contenido de Humedad (%)</b>	9,41 ± 0,50	17,73 ± 0,48
<b>Solubilidad en agua (%)</b>	25,2 ± 0,80	43,21 ± 0,80

Bourbon y col. (2011) también encontraron que la incorporación de compuestos bioactivos en películas a base de Ch condujo a un aumento del contenido de humedad y solubilidad en agua. Este aumento podría estar relacionado con el mayor número de moléculas cargadas que presentan una mayor capacidad para adsorber agua (Anker y col., 1999). Los compuestos fenólicos y flavonoides tienen grupos polares (-OH) (Dominguez y col., 1989) que aumentan la solubilidad en agua de las películas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tongdeesoontorn y col. (2011) donde el agregado de quercetina y terbutilhidroquinona (TBHQ) sobre películas a base

## Resultados y discusión

---

de almidón de mandioca y gelatina, provocó un aumento en el contenido de humedad y solubilidad en agua de las películas evaluadas.

### **IV.4.4. Propiedades mecánicas**

Es importante evaluar las propiedades mecánicas de un film ya que se requiere contar con un recubrimiento que mantenga su integridad con el fin de soportar el estrés que se produce durante la manipulación y el almacenamiento del producto alimenticio (Kannat y col., 2012). La resistencia a la tracción, TS, es una medida de la fuerza máxima que un film puede resistir frente a una tensión de tracción aplicada; mientras que el porcentaje de alargamiento, E, representa la habilidad del film para estirarse, antes de quebrarse (Park y col., 2004). TS, que toma en consideración el espesor de película, fue utilizado ya por Gennadios y col. (1993) y Park y col. (1993) con el fin de comparar películas de diferentes espesores y diferentes tipos de interacción (por ejemplo, mediante la adición de agentes plastificantes).

Según los resultados presentados en la tabla 8, TS, y %E, aumentaron de  $27,25 \pm 5,50$  para Ch a  $35,64 \pm 4,90$  para Ch-Q, y de  $50,28 \pm 6,35$  para Ch a  $52,49 \pm 4,05$  para Ch-Q, respectivamente. El efecto sobre el fortalecimiento de las películas puede ser explicado de manera similar a lo desarrollado para WVP y densidad. La mejora en las propiedades mecánicas de los films a base de Ch-Q puede atribuirse a la interacción entre la matriz de Ch y la Q. Los cambios en las propiedades mecánicas debido a compuestos polifenólicos

## Resultados y discusión

también fueron observados en otras películas biopoliméricas, incluyendo los taninos vegetales en películas de proteína aisladas de girasol (Orliac y col., 2002), extracto de hoja de murta en películas de gelatina de atún (Gómez-Guillén y col., 2007) y extracto antioxidante de borraja en películas de gelatina de pescado (Gómez-Estaca y col., 2009).

**Tabla 8.** Efecto de la derivatización de Ch nativo con Q sobre las propiedades mecánicas: TS, y %E

Propiedades	Resultados	
	Ch	Ch-Q
Tensión en la carga máxima, TS (Mpa)	27,25 ± 5,50	35,64 ± 4,90
Deformación en la carga máxima, E (%)	50,28 ± 6,35	54,49 ± 4,05

El grado de reticulación aumenta la resistencia mecánica de las películas, haciéndolas más resistentes y que requieran de una mayor fuerza de ruptura (Benavides y col., 2012). Los compuestos fenólicos contienen grupos OH que formaron enlaces de hidrógeno (Arcan y col., 2011) con el Ch, desarrollando una estructura polimérica más rígida y, por tanto, provocando un aumento de TS. Esta observación concuerda con los resultados de Siripatrawan y Harte (2010), quienes también informaron una mejora de TS de las películas de Ch con la incorporación de extracto de té verde y lo

## Resultados y discusión

---

atribuyeron a la interacción entre la matriz de Ch y los compuestos polifenólicos del extracto de té verde. Del mismo modo, Sivarooban, Hettiarachchy y Johnson (2008) observaron que la incorporación de extracto de semilla de uva aumentó significativamente la TS de películas a base de proteína de soja.

El contenido de humedad del film puede afectar sus propiedades mecánicas (Martins y col., 2012). La presencia de Q provocó un aumento del contenido de agua del film, resultando en un incremento del %E. El agua contenida en la matriz polimérica actúa como plastificante, con lo cual al tener mayor humedad, es esperable un aumento en la elasticidad (Rivero y col., 2010). Está demostrado que la acción de los plastificantes es modificar la red polimérica creando regiones móviles, aumentando las distancias entre las cadenas y compitiendo por los enlaces hidrógeno entre las moléculas de Ch (Cerqueira y col., 2012). Si bien se produjo un aumento de E para los films de Ch-Q, este fue sólo del 8% (tabla 8) respecto del valor promedio obtenido para los films a base de Ch. Estos resultados demostrarían que el firme entrecruzamiento formado en los films de Ch-Q ejercería una mayor influencia sobre la elasticidad, disminuyéndola, que el efecto provocado por un aumento en la movilidad molecular debido a la presencia de agua retenida. El grado de movilidad y el volumen libre generado por la presencia de agua en el film de Ch-Q, no fue lo suficientemente significativo frente al aumento del grado de reticulación del polímero, como para aumentar el valor de %E respecto del film de Ch.



## Resultados y discusión

---

### IV.4.5. Propiedades microbiológicas

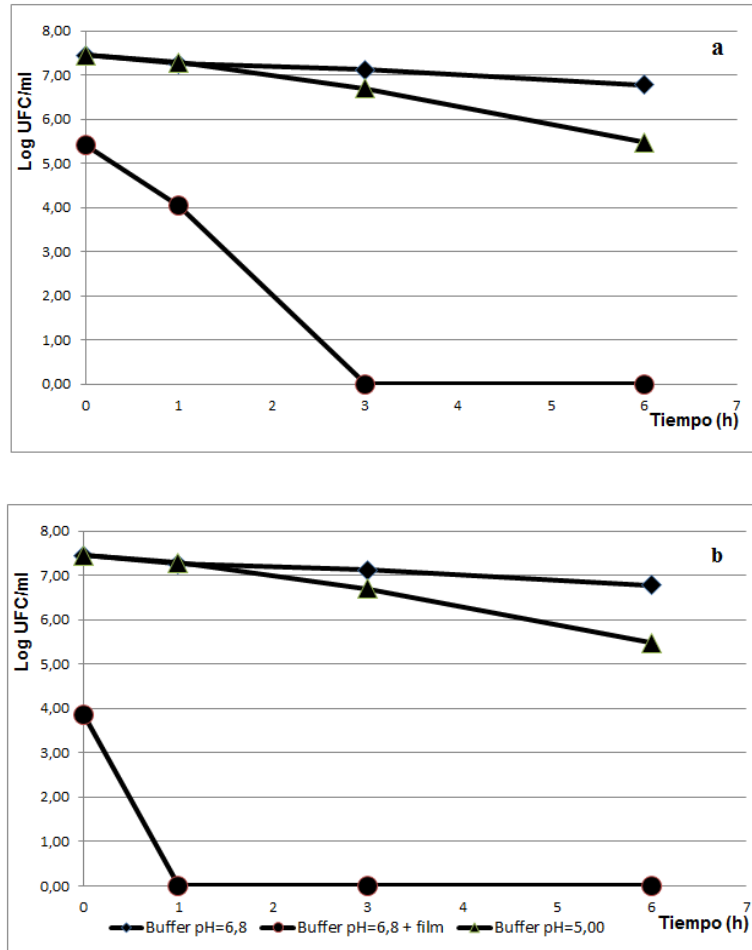
#### IV.4.5.1. Capacidad antimicrobiana *in vitro*

Las propiedades antimicrobianas de los films fueron evaluadas según el método estándar ASTM E2149-0, que considera el efecto causado por la fracción soluble del film.

Los resultados obtenidos respecto de la capacidad antimicrobiana en función del tiempo de contacto con el film a base de Ch, Ch-Q y los controles en buffer a pH 5,0 y 6,8, frente a *E. coli* se observan en la figura 32a y 32b, respectivamente. Mientras que los encontrados para *S. aureus* en función del tiempo de contacto con el film a base de Ch y Ch-Q se presentan en la figura 33a y 33b, respectivamente.

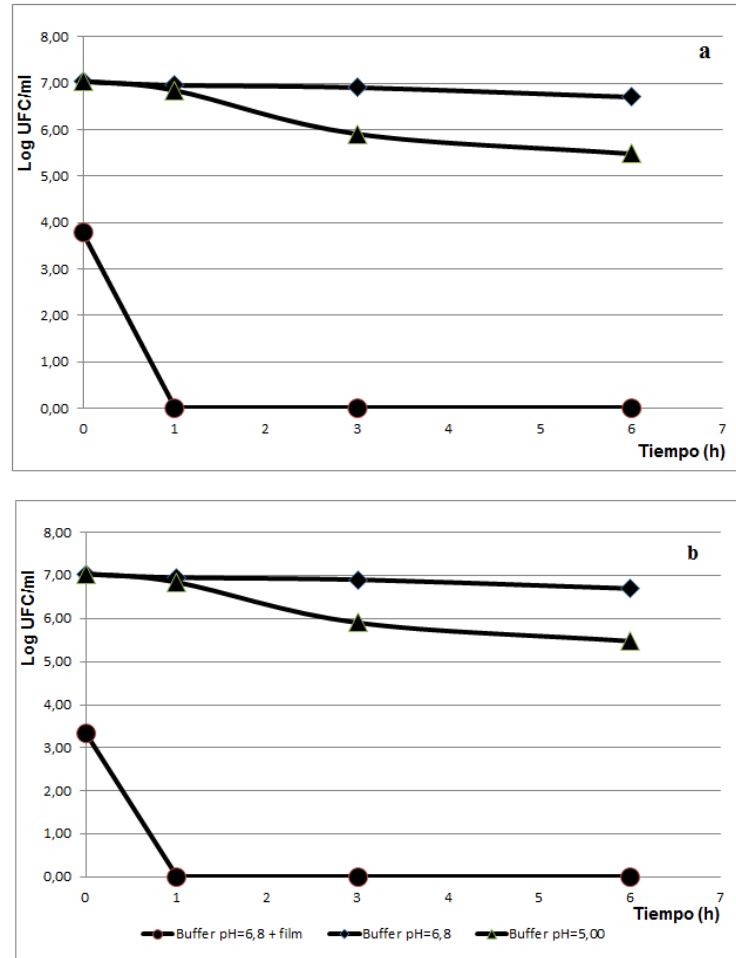
Puede observarse que, ambos tratamientos (Ch y Ch-Q) poseen una notable actividad antimicrobiana frente a los microorganismos evaluados, demostrando sólo un pequeño aporte del pH del medio, el cual también disminuye a tiempos más prolongados de contacto, logrando un efecto sinérgico entre las cargas positivas del quitosano (grupos amino protonado,  $\text{NH}_3^+$ ) y los bajos valores de pH (menores que su pKa), favorable para la actividad antimicrobiana, ya que facilita la interacción con las cargas negativas de las membranas celulares, fenómeno susceptible de provocar la pérdida de los constituyentes intracelulares (Aider, 2010).

## Resultados y discusión



**Figura 33.** Viabilidad de *E. coli* en función del tiempo de contacto con el film a base de Ch (a); y con el film a base de Ch-Q (b): buffer pH=6,8 (◆); buffer pH=6,8 + film (●); buffer pH=5,0 (▲).

## Resultados y discusión



**Figura 34.** Viabilidad de *S. aureus* en función del tiempo de contacto con el film a base de Ch (a); y con el film a base de Ch-Q (b): buffer pH=6,8 (◆); buffer pH=6,8 + film (●); buffer pH=5,0 (▲).

## Resultados y discusión

---

Puede observarse que al tiempo 0 h, se obtuvo una reducción instantánea en el recuento de ambos microorganismos evaluados, en contacto con los films de Ch y Ch-Q, observándose una mayor reducción para *S. aureus*, resultando ser este más sensible que *E. coli*, para ambos films ensayados (tabla 9).

Respecto de la actividad frente a *S. aureus*, la fracción soluble de ambos films redujeron más de 7 log a partir de la primera hora de contacto con cada film a 37°C (tabla 9), lográndose de esta manera un 100% de reducción. Sin embargo, para *E. coli* esta misma reducción se logró luego de la tercera hora de contacto con el film de Ch (obteniéndose un 45 %R después de 1 h de contacto), y luego de la primera hora de incubación con el film a base de Ch-Q.

**Tabla 9.** Porcentaje de reducción (%R) de *E. coli* y *S. aureus* en función del tiempo de contacto con el film a base de Ch y Ch-Q

Tiempo	%R			
	Film Ch		Film Ch-Q	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>0</b>	27,32	46,33	45,95	55,29
<b>1</b>	44,48	100	100	100
<b>3</b>	100	100	100	100
<b>6</b>	100	100	100	100

## Resultados y discusión

---

Los resultados obtenidos demuestran que el 100 %R frente a *S. aureus* fue alcanzado a menor tiempo que *E. coli* evaluando el film a base de Ch, indicando que el primero presenta una mayor sensibilidad para ambos films evaluados. Además, es importante resaltar que la funcionalización de Ch con Q, incrementó el %R para ambos microorganismos, en comparación con film de Ch nativo. En un estudio realizado por Liu et al. (2004), *E. coli* fue tratado con 0,5% p/v y 0,25% p/v de Ch de bajo PM (78 kDa) resultando en una completa inactivación del microorganismo debido a que la membrana externa de las células bacterianas había sido alterada y cubierta por el polímero.

En la bibliografía, respecto de la actividad antimicrobiana, es reconocido de manera general que las levaduras y los hongos son los grupos más sensibles al Ch, seguido por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Aider, 2010). Lin, Lin y Chen (2009) encontraron que quitosano con bajo PM y 80% y 92% GDA tuvo un efecto antibacteriano más fuerte hacia *E. coli* que hacia *S. aureus*.

El carácter antimicrobiano del Ch se debe a su grupo amino cargado positivamente, el cual interactúa con la membrana de la célula microbiana cargada negativamente, conduciendo a la salida de los componentes intracelulares, y por ende, a la inactivación del microorganismo (Zivanovic y col., 2015). Sin embargo, Raafa y col., (2008) demostraron que el modo de acción del Ch es probablemente más complejo que la sencilla interacción de

## Resultados y discusión

---

este con la membrana celular, e implica una serie de eventos, que en última instancia pueden conducir a un proceso de muerte del microorganismo.

El PM y el %GDA del Ch también afectan la intensidad de unión entre el Ch y las superficies bacterianas. Ha sido demostrada la dependencia que existe entre la variación del %GDA y el efecto que ejercen los diferentes tipos de Ch sobre el desarrollo de los microorganismos (González-Peña Fundora y col., 2013). Zheng y Zhu (2003) propusieron que, el Ch con un PM alto forma un "escudo" y evita la entrada y salida de nutrientes de la célula, mientras que el Ch de PM menor entra a la célula, se adhiere a los compuestos en el citoplasma provocando la floculación y alteración de los procesos fisiológicos. La alta capacidad antimicrobiana obtenida se explicaría además por el beneficio de utilizar Ch de bajo PM y alto grado de desacetilación. Cuanto menor sea el PM del biopolímero y mayor %GDA, se espera una mayor actividad antimicrobiana ya que se aumenta la solubilidad y densidad de carga del Ch, siendo importante para la capacidad de adhesión de este con la pared celular (Aider, 2010).

Se ha demostrado que la incorporación de Q al Ch no resulta en una pérdida de la eficiencia antimicrobiana. La disponibilidad de grupos amino cargados positivamente en el Ch derivatizado, que hace que sea bioadhesivo para las superficies microbianas cargadas negativamente, no es perturbado por la presencia de Q, logrando una molécula con efecto antimicrobiano aún de mayor eficacia debido a la su capacidad para disminuir la regeneración celular bacteriana (Cushnie y col., 2005). La hidrofobicidad de la Q permite

## Resultados y discusión

---

interactuar con la membrana celular bacteriana. Esta distorsión estructural provoca el deterioro de la membrana e incrementa su permeabilidad. Además, se ha descrito que los componentes fenólicos suprimen el transporte de calcio y potasio debido a la ruptura en la fase lipídica de la membrana y posteriormente a la alteración de los canales de calcio (Altiok y col., 2010). El grupo hidroxilo libre en el anillo bencénico se considera esencial para la actividad antifúngica y antimicrobiana de la Q, y dado que este grupo no se ve afectado por el proceso de derivatización, el grupo fenólico compensaría parcialmente las propiedades antifúngicas/antimicrobianas "perdidas" del grupo amino en el Ch nativo (Bozic y col, 2012).

### **IV.4.6. Propiedades antioxidantes**

Se evaluó la capacidad antioxidante de la fracción soluble de las películas frente al radical  $O_2^{\bullet-}$  y  $\bullet OH$ . En las condiciones del ensayo, ambos films se solubilizaron totalmente, obteniéndose una concentración de 0,38 mg/ml de Ch y Ch-Q en solución. El cálculo se realizó teniendo en cuenta el peso de cada film y la concentración empleada en la formulación de las películas. En la tabla 10 se expresa el %D de las EROS  $O_2^{\bullet-}$  y  $\bullet OH$  en función de la concentración de Ch y Ch-Q solubilizado, y las diferencias de desactivación encontradas entre las fracciones solubles de ambas películas.

## Resultados y discusión

**Tabla 10.** Porcentaje de desactivación (% D) frente a radical  $O_2^{\bullet-}$  y  $\bullet OH$  de la fracción soluble (0,38 mg/ml) de las películas de Ch y Ch-Q

Film	% D $O_2^{\bullet-}$	% D $\bullet OH$
Ch	40,19	67,30
Ch-Q	52,60	73,97
Diferencia (%)	12.41	6,67

Los resultados obtenidos demuestran que los films a base de Ch-Q presentaron un mayor efecto antioxidante frente a ambas especies radicalarias respecto de la fracción soluble del film a base de Ch. Se obtuvo un %D de 52,60% para el radical  $O_2^{\bullet-}$  y 73,97% para el radical  $\bullet OH$ , en comparación con el 40,19% y 67,30% obtenidos con el film a base de Ch nativo, respectivamente. Considerando ambas especies radicalarias, es posible observar que la diferencia positiva en el %D de  $O_2^{\bullet-}$  que presenta el film de Ch-Q es aproximadamente el doble que la mostrada para el  $\bullet OH$ ; esto resulta favorable ya que, comparado con otros, el  $O_2^{\bullet-}$  es uno de los radicales más tóxicos, presenta un tiempo de vida mayor y, por lo tanto, resulta ser más peligroso (Cirillo y col., 2012).

Fras-Zemljic, Kokol y Cakara (2011) evaluaron la capacidad antioxidante de fibras de Ch derivatizado con Q modificada enzimáticamente, frente al  $O_2^{\bullet-}$  y demostraron que hubo un aumento en la actividad antioxidante de las muestras analizadas. La Q posee un grupo OH



## Resultados y discusión

---

dentro de su estructura que no es afectado por la enzima y hace que resulte en un antioxidante más efectivo.

La capacidad antioxidante del flavonoide, no sólo está relacionada con el número de grupos OH presentes en la molécula, sino también con la habilidad de éstos para ceder átomos de H (Lemanska y col., 2001), siendo éste, uno de los mecanismos principales para impedir o ralentizar las reacciones en cadena de los radicales (Rong y col., 2012). La presencia del flavonoide Q en la molécula de Ch podría aumentar el grado de desprotonación de la molécula e incrementar la actividad antioxidante de la fracción soluble del film. La Q pura tiene dos grupos OH en las posiciones 5 y 7 del anillo A (Figura 30). El grupo en la posición 7 es más ácido ya que tiene un valor de pKa de 7,5, mientras que el otro grupo en la posición 5 tiene un valor de pKa de 9.4. Fras-Zemljic, Kokol y Cakara (2011) demostraron que estos valores cambian cuando la Q se encuentra en estado oxidado, presentando un pKa de 5,8 y 9,8, respectivamente. Los cambios en los valores de pKa pueden ocurrir como consecuencia de varios factores. Las interacciones electrostáticas entre los grupos OH cargados negativamente de los flavonoides y los grupos  $\text{NH}_3^+$  cargados positivamente del Ch llevan a la estabilización de los OH desprotonados, y por lo tanto tienden a bajar los valores de sus pKa. Por otra parte, si el grupo OH se encuentra en un ambiente hidratado, que puede ocurrir en este caso como consecuencia de una mayor solubilidad, tiende a facilitar la cesión de  $\text{H}^+$  y disminuir el pKa. Ha sido demostrado que la desprotonación del OH tiene una gran influencia

## Resultados y discusión

---

sobre el potencial antioxidante intrínseco del flavonoide, el aumento del grado de desprotonación generalmente mejora la acción antioxidante del flavonoide (Van Acker y col., 1996).

### **IV.5. Estabilidad de vegetales recubiertos**

El recubrimiento obtenido fue uniforme, sin grietas y se distribuyó en toda la superficie de las rodajas de zanahorias sin afectar el color ni la apariencia normal de las mismas. Luego de 14 días de almacenamiento bajo refrigeración, las muestras SR presentaron síntomas de deshidratación mayor que las rodajas recubiertas con ambas soluciones (Ch y Ch-Q).

#### **IV.5.1. Capacidad antimicrobiana**

El Ch tiene propiedades antibacterianas y antifúngicas naturales extensamente evaluadas para un amplio espectro de microorganismos (Pacheco y col., 2008). En las últimas décadas Ch está siendo estudiado como un potencial agente antimicrobiano natural en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Goosen, 1997; Ravi Kumar, 2000; Shahidi y col., 1999; Elsabee y col., 2013).

Para el análisis y evaluación de los resultados encontrados respecto de la capacidad antimicrobiana de las muestras de zanahorias, sin recubrir (SR) y recubiertas con la solución formadora de film a base de Ch (Ch) y a base de

## Resultados y discusión

---

Ch-Q (Ch-Q), se realizó un análisis estadístico de los datos a través de un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Rangos Múltiples (LSD) y Prueba de Hipótesis, con un nivel de significancia de 0,05. Los cálculos correspondientes se efectuaron con el programa estadístico Statgraphics® Centurion XV en su versión 15.2.05.

### **IV.5.1.1. Recuento de *S. aureus***

Todas las muestras estudiadas mostraron ausencia de *S. aureus*. Tanto la muestra de zanahoria fresca SR como las muestras Ch y Ch-Q a los tiempos 0, 4, 8 y 14 días, no presentaron crecimiento de esta bacteria Gram +. Resultados similares fueron reportados por Durango, Soares y Andrade (2006) donde evaluaron la capacidad antimicrobiana de recubrimientos a base de Ch y Ch-almidón sobre rodajas de zanahorias mínimamente procesadas almacenadas bajo refrigeración durante 15 días.

### **IV.5.1.2. Recuento de bacterias coliformes totales**

En todas las muestras evaluadas y durante los 14 días de almacenamiento se obtuvo un recuento negativo para *E. coli*.

Al inicio del ensayo, ninguna de las muestras presentó recuento de coliformes totales. Sin embargo, la muestra SR ya al día 4 de almacenamiento mostró presencia de coliformes totales (4,4 log UFC/g) y

## Resultados y discusión

---

fecales (9 NMP/g), siendo negativo el recuento para *E. coli*. Esta muestra presentó el mismo comportamiento durante el período restante de almacenamiento (8 y 14 días). Las muestras de Ch presentaron 3,6 log UFC/g de coliformes totales al día 4 y 14, siendo negativo el recuento de coliformes fecales. Respecto de las muestras Ch-Q, no se observó presencia de coliformes totales en ninguno de los tiempos estudiados, indicando acción antimicrobiana sobre este grupo de microorganismos. La incorporación de Q demostró tener un efecto sinérgico con el Ch; los mismos resultados fueron encontrados cuando se evaluó la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los films.

Zheng y Zhu (2003) mostraron que Ch al 1% p/v con un %GDA de 88,7 y PM de 48,5 kDa, tuvo un efecto antimicrobiano frente a *E. coli* y *S. aureus* con una tasa de inhibición del 100% en el crecimiento de estos microorganismos. Concentraciones de 1% p/v de Ch lograron reducir entre 1 y 2 ciclos logarítmicos en el recuento total de bacterias en pequeños pasteles de carne; concentraciones de 0,2% p/v y 0,5% p/v no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre la microflora deteriorante, pero el número de bacterias antes de iniciar el ensayo fue mayor a  $10^7$  UFC/g, y el Ch es probable que sea más efectivo frente a poblaciones microbianas bajas (Darmadji y col., 1994).

Torres y col. (2012) evaluaron la capacidad antimicrobiana de soluciones ácidas de Ch nativo y Ch modificado con Q al 0,3% p/v sobre muestras de cactus. Los resultados encontrados mostraron que el Ch redujo  $10^3$  UFC/ml de *E. coli* y *S. aureus*, mientras que el recubrimiento de Ch-Q

## Resultados y discusión

---

fue capaz de reducir  $10^7$  UFC/ml de ambos microorganismos, mostrando un mayor efecto antimicrobiano que el Ch nativo.

### **IV.5.1.3. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales**

La actividad antimicrobiana de las muestras SR, Ch y Ch-Q frente a microorganismos mesófilos, se evaluó únicamente al inicio del ensayo (tiempo = 0 d) ya que las muestras fueron almacenadas bajo refrigeración a 4 °C durante 14 días.

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos respecto de la capacidad antimicrobiana frente a microorganismos mesófilos aerobios, los resultados del ANOVA demuestran que el factor *Tratamiento* tuvo un efecto estadísticamente significativo con un *valor-P* menor que 0,0001, con un 95% de confianza, no teniendo el factor *Repeticiones* influencia sobre la variable log UFC/g (*valor-P* = 0,4444).

Los resultados obtenidos muestran que, la muestra SR presentó un recuento inicial mayor ( $\sim 10^6$  UFC/g) comparado con las muestras sometidas a ambos recubrimientos. Las muestras de Ch mostraron una carga inicial promedio de  $10^5$  UFC/g, mientras que las muestras de Ch-Q son las que tuvieron la menor carga, con  $10^4$  UFC/g. Ambos recubrimientos provocaron una reducción de 1,50 y 2,00 ciclos logarítmicos respectivamente, demostrando una reducción inmediata al inicio del ensayo. Al aplicar el test

## Resultados y discusión

---

LSD (tabla 11), los resultados demuestran que, SR, Ch y Ch-Q, presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Tabla 11.** Test LSD para log UFC/g de microorganismos mesófilos por Tratamiento aplicado a las muestras al inicio del ensayo. Se presentan los valores medios de log UFC/g y el valor de desviación estándar. Letras iguales no presentan diferencias significativas

<b>Tratamientos</b>	<b>Tiempo 0 d</b>
<b>SR</b>	6,4800 ± 0,0001
<b>Ch</b>	5,0033 ± 0,0252
<b>Ch-Q</b>	4,4800 ± 0,0001

Mediante la Prueba de Hipótesis se confirman los resultados encontrados con el ANOVA y el LSD. Se plantea como Hipótesis Nula ( $H_0$ ) que no hay diferencias entre las medias (diferencia entre medias = 0,0) y como Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ) que sí existen diferencias entre medias (las medias no son iguales). Como se muestra en la Tabla 12, el *Valor-P* en todos los comparativos es menor que 0,05, con lo cual, puede rechazarse la  $H_0$  con un 95,0% de nivel de confianza, demostrando que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

## Resultados y discusión

---

**Tabla 12.** Test de Hipótesis para microorganismos mesófilos. Hipótesis Nula: diferencia entre medias = 0,0. Hipótesis Alternativa: diferencia entre medias  $\neq$  0,0

Contraste	Tiempo 0 d
Ch – Ch-Q	0,0008
Ch – SR	0,0001
Ch-Q – SR	0,0001

Los resultados se corresponden con los presentados por Chervin y Boisseau (1992), quienes encontraron que el número de microorganismos aerobios mesófilos en zanahorias mínimamente procesadas fue de 6,7 log UFC/g. Buick y Damoglou (1987) mostraron que el 70% de la microbiota inicial en rodajas de zanahorias mínimamente procesadas corresponde a la especie *Erwinia*, la cual ataca a la zanahoria causando la denominada podredumbre húmeda bacteriana (Mueller, 1981).

### IV.5.1.4. Recuento de hongos y levaduras

Respecto de la acción de los recubrimientos frente a hongos y levaduras, las muestras Ch y Ch-Q presentan un buen desempeño en el control de hongos y levaduras (tabla 13). Respecto del %R, puede observarse que a todos los tiempos evaluados (exceptuando el tiempo 0 d) se presentó una reducción mayor al 10% para ambos tratamientos, Ch y Ch-Q, respecto

## Resultados y discusión

de SR; destacándose una mayor reducción para las muestras con Ch-Q a los tiempos 4 y 8 d de almacenamiento.

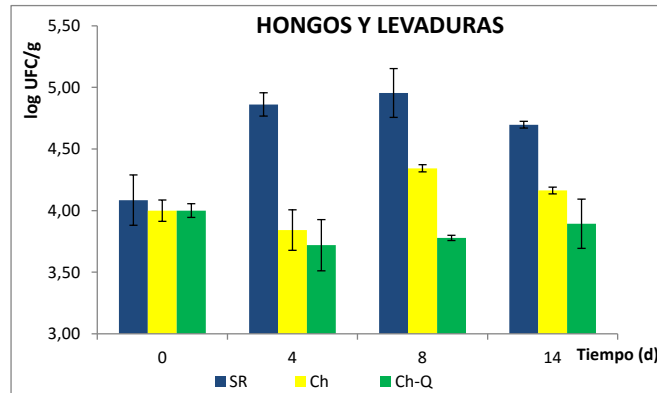
**Tabla 13.** Recuento de hongos y levaduras (log UFC/g) en función del tiempo de almacenamiento y %R obtenidos entre los diferentes tratamientos evaluados

Tiempo (d)	Tratamientos				
	SR	Ch		Ch-Q	
	log UFC/g	log UFC/g	%R	log UFC/g	%R
0	4,09	4,00	2,20	4,00	2,20
4	4,86	3,84	20,99	3,72	23,46
8	4,95	4,34	12,32	3,78	23,64
14	4,70	4,16	11,49	3,89	17,23

Como se puede ver en la figura 35, el recubrimiento a base de Ch-Q presenta la mayor acción fungicida; mostrando un menor recuento de hongos y levaduras a todos los tiempos evaluados, exceptuando al inicio del ensayo que las muestras recubiertas presentaron la misma carga. Puede observarse, además, que si bien las muestras de Ch y Ch-Q presentaron un aumento en el log UFC/g en el día 8 de almacenamiento, se obtuvo una reducción de 0,52 y 0,66 ciclos log, respectivamente, frente a SR (que tuvo un aumento de 0,61 ciclos log) comparando la carga inicial de hongos y levaduras respecto de la presentada luego de los 14 días de almacenamiento.



## Resultados y discusión



**Figura 35.** Efecto de los recubrimientos frente a hongos y levaduras de zanahorias mínimamente procesadas almacenadas a 4 °C durante 14 días.

Analizando estadísticamente los resultados respecto de la capacidad antimicrobiana frente a hongos y levaduras a cada tiempo, se puede observar que los resultados del ANOVA, presentados en la tabla 14, demuestran que al inicio del ensayo (tiempo = 0 d) el recubrimiento y las repeticiones no ejercen efecto estadísticamente significativo sobre el log UFC/g. A partir del día 4 de almacenamiento, el factor *Tratamiento* tuvo un efecto estadísticamente significativo (con un *valor-P* menor que 0,05) sobre el recuento de hongos y levaduras con un 95% de confianza, no teniendo el factor *Repeticiones* influencia sobre la variable log UFC/g.

## Resultados y discusión

**Tabla 14.** Análisis de Varianza para hongos y levaduras a los tiempos 0, 4, 8 y 14 días de almacenamiento bajo refrigeración de las muestras con diferentes tratamientos (SR, Ch, Ch-Q)

Tiempo (d)	Valor-P	
	Tratamientos	Repeticiones
0	0,4883	0,4444
4	0,0002	0,6998
8	0,0094	0,7033
14	0,0441	0,4860

Mediante el test LSD (tabla 15), se analiza específicamente cómo es la influencia de cada tratamiento a cada tiempo ensayado. Al tiempo = 0 d, las muestras SR, Ch y Ch-Q no presentan diferencias estadísticamente significativas, es decir, se inicia el ensayo con un recuento de hongos y levaduras similar para las 3 muestras ( $\sim 10^4$  UFC/g).

Evaluando los recubrimientos Ch y Ch-Q, éstos presentaron diferencias estadísticamente significativas solamente a los 8 días de almacenamiento, no encontrándose diferencias entre ambos tratamientos en los tiempos restantes. También es posible observar que luego de 14 días de almacenamiento, el recuento para SR y Ch no presentó diferencias estadísticamente significativas, pero sí el primero con el recubrimiento Ch-Q, es decir, las muestras de zanahorias tratadas con la solución formadora de

## Resultados y discusión

film a base de Ch, presentó una menor actividad antifúngica que el tratamiento con Ch-Q al finalizar el ensayo.

Se observa, además, que Ch-Q, durante todo el tiempo de almacenamiento, presenta diferencias estadísticamente significativas respecto de SR, teniendo en cuenta que la carga inicial de hongos y levaduras de ambas muestras es similar. Resultando ser el tratamiento Ch-Q el más efectivo durante todo el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración.

**Tabla 15.** Test LSD para log UFC/g de hongos y levaduras por Tratamiento aplicado a las muestras a los 4 tiempos evaluados. Se presentan los valores medios de log UFC/g y el valor de desviación estandard. Letras iguales no presentan diferencias significativas

Tratamientos	Tiempo (d)			
	0	4	8	14
SR	4,08 ± 0,16a	4,86 ± 0,06	4,95 ± 0,19	4,69 ± 0,08c
Ch	4,00 ± 0,00a	3,84 ± 0,06b	4,34 ± 0,17	4,16 ± 0,06cd
Ch-Q	4,00 ± 0,00a	3,72 ± 0,10b	3,77 ± 0,25	3,89 ± 0,42d

Mediante la Prueba de Hipótesis se confirman los resultados encontrados con el ANOVA y el LSD. Se plantea como Hipótesis Nula ( $H_0$ ) que no hay diferencias entre las medias (diferencia entre medias = 0,0) y como Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ) que sí existen diferencias entre medias (las medias no son iguales). Como se muestra en la tabla 16, cuando el *Valor-P* es menor que 0,05, puede rechazarse la  $H_0$  con un 95,0% de nivel de

## Resultados y discusión

---

confianza. A partir del cuarto día de almacenamiento, el comparativo de las muestras Ch-SR y Ch-Q – SR presentó diferencias estadísticamente significativas, confirmando que sólo al tiempo 8, también puede rechazarse la  $H_0$  para el comparativo de muestras Ch – Ch-Q.

**Tabla 16.** Test de Hipótesis para hongos y levaduras. Hipótesis Nula: diferencia entre medias = 0,0. Hipótesis Alternativa: diferencia entre medias  $\neq 0,0$

	<i>Valor-P</i>			
	Tiempo (d)			
	Contraste	0	4	8
<b>Ch – Ch-Q</b>	1,0000	0,1500	0,0339	0,3854
<b>Ch – SR</b>	0,4511	< 0,0001	0,0150	0,0009
<b>Ch-Q – SR</b>	0,4511	0,0001	0,0170	0,0325

Diversos estudios han demostrado que el efecto del Ch sobre algunos hongos se debe principalmente a las alteraciones en las funciones de la membrana celular. La principal enfermedad causada por hongos en zanahorias es la putrefacción por *Sclerotinia* (Fang y col., 1994).

### IV.5.1.5. Recuento de microorganismos psicrótrofos

Los recuentos obtenidos de microorganismos psicrótrofos para las muestras SR, Ch y Ch-Q durante los 14 días de almacenamiento bajo refrigeración se presentan en la tabla 17. Además, se muestra el %R obtenido

## Resultados y discusión

---

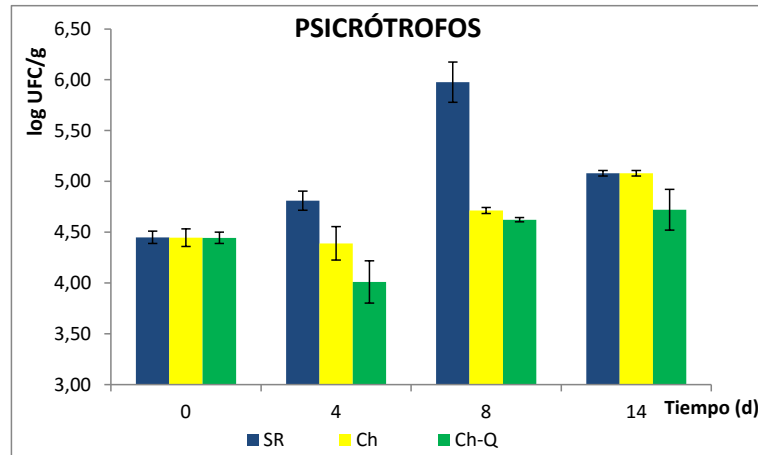
al recubrir las muestras con solución formadora de film a base de Ch y Ch-Q, respecto de las muestras control, SR. Puede observarse que el mayor %R se obtuvo al día 8 para ambos tratamientos, Ch y Ch-Q.

**Tabla 17.** Recuento de microorganismos psicrótrofos (log UFC/g) en función del tiempo de almacenamiento y %R obtenidos entre los diferentes tratamientos evaluados

Tiempo (d)	Tratamientos				
	SR		Ch		Ch-Q
	log UFC/g	log UFC/g	%R	log UFC/g	%R
<b>0</b>	4,44	4,44	0,00	4,44	0,00
<b>4</b>	4,81	4,39	8,74	4,01	16,61
<b>8</b>	5,98	4,71	21,16	4,62	22,66
<b>14</b>	5,08	5,08	0,00	4,72	7,08

En la figura 36 se grafica el recuento (log UFC/g) de microorganismos psicrótrofos que presentaron las muestras de zanahorias SR y recubiertas con solución formadora de film a base de Ch y Ch-Q, en función de los 14 días de almacenamiento bajo refrigeración.

## Resultados y discusión



**Figura 36.** Efecto de los recubrimientos frente a bacterias psicrótrofas de zanahorias mínimamente procesadas almacenadas a 4 °C durante 14 días

La muestra Ch-Q mostró un buen control del desarrollo de microorganismos psicrótrofos durante todo el ensayo observándose sólo un aumento de 0,30 ciclos log, frente a las muestras SR y Ch que presentaron un aumento de 0,63 ciclos log, comparando la carga inicial de microorganismos frente a la presentada luego de los 14 días de almacenamiento.

Analizando estadísticamente los resultados respecto de la capacidad antimicrobiana frente a microorganismos psicrótrofos a cada tiempo, se puede observar que los resultados del ANOVA, presentados en la tabla 18, demuestran que durante todo el tiempo de almacenamiento, el recubrimiento aplicado sobre las muestras (factor *Tratamiento*) tuvo un efecto

## Resultados y discusión

estadísticamente significativo (con un *valor-P* menor que 0,05) sobre el recuento de psicrótrofos con un 95% de confianza, exceptuando al inicio del ensayo; no teniendo el factor *Repeticiones* influencia sobre la variable log UFC/g.

**Tabla 18.** Análisis de Varianza para psicrótrofos a los tiempos 0, 4, 8 y 14 días de almacenamiento en refrigeración de las muestras con diferentes recubrimientos

<b>Tiempo (d)</b>	<b>Valor-P</b>	
	<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>0</b>	0,0070	0,0948
<b>4</b>	0,0122	0,5665
<b>8</b>	0,0003	0,5562
<b>14</b>	0,0234	0,3149

Mediante el test LSD (tabla 19), se puede observar que a los tiempos 4 y 8 días, existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras SR y las muestras recubiertas con solución formadora de film a base de Ch y Ch-Q, exceptuando a los 14 días, donde SR y Ch no presentan diferencias. Además, podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre Ch y Ch-Q hasta los 8 días de almacenamiento. Resultando ser el tratamiento Ch-Q el más efectivo durante todo el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración.

## Resultados y discusión

**Tabla 19.** Test LSD para log UFC/g de microorganismos psicrótrofos por Tratamiento aplicado a las muestras a los 4 tiempos evaluados. Se presentan los valores medios de log UFC/g y el valor de desviación estándar. Letras iguales no representan diferencias significativas

Tratamientos	Tiempo (d)			
	0	4	8	14
SR	4,44 ± 0,08a	4,81 ± 0,09	5,97 ± 0,19	5,08 ± 0,02d
Ch	4,44 ± 0,08a	4,38 ± 0,16b	4,71 ± 0,02c	5,08 ± 0,02d
Ch-Q	4,44 ± 0,05a	4,01 ± 0,20b	4,62 ± 0,02c	4,72 ± 0,20

Mediante la Prueba de Hipótesis se confirman los resultados encontrados en el ANOVA y el LSD. Se plantea como Hipótesis Nula ( $H_0$ ) que no hay diferencias entre las medias (diferencia entre medias = 0,0) y como Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ) que sí existen diferencias entre medias (las medias no son iguales). Como se muestra en la tabla 20, cuando el *Valor-P* es menor que 0,05, puede rechazarse la  $H_0$  con un 95,0% de nivel de confianza, es decir, en estos casos sí se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.



## Resultados y discusión

---

**Tabla 20.** Test de Hipótesis para microorganismos psicrótrofos. Hipótesis Nula: diferencia entre medias = 0,0. Hipótesis Alternativa: diferencia entre medias  $\neq$  0,0

<b>Contraste</b>	<b>Valor-P</b>			
	<b>Tiempo (d)</b>			
	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<b>Ch - Ch-Q</b>	0,9798	0,0685	0,6297	0,0369
<b>Ch - SR</b>	0,9798	0,0186	0,0004	1,0000
<b>Ch-Q - SR</b>	0,9798	0,0037	0,0003	0,0369

Según Garg, Churey y Splittstoesser (1990) la vida útil de los vegetales refrigerados es especialmente afectada por la población de psicrótrofos, siendo la especie *Pseudomonas* la principal responsable de su deterioro. Diversos autores han encontrado un recuento de microorganismos psicrótrofos en zanahorias mínimamente procesadas compradas en supermercados que van desde  $10^6$  a  $10^9$  UFC/ml (Rosa, 2002). En nuestro caso, la carga inicial de estos microorganismos fue menor ( $10^4$  UFC/ml), seguramente la etapa de pelado y lavado previo influyó sobre el recuento inicial.

El Ch ha sido reportado con capacidad para inhibir diversos deterioros bacterianos a través de sus capacidades para unirse con el agua e inactivar

## Resultados y discusión

---

diversas enzimas, y a través de su capacidad de absorber los nutrientes utilizados normalmente por las bacterias (Ouattara y col., 2000).

### **IV.5.2. Actividad antioxidante**

El ácido ascórbico (AA) y los carotenoides se encuentran entre los compuestos más importantes presentes en frutas y verduras ya que tienen un papel beneficioso para la salud. Ambos actúan como antioxidantes contra una gran variedad de enfermedades (Temple, 2000; Oshima y col., 1996; Astorg, 1997; Frenich y col., 2005).

#### **IV.5.2.1. Determinación del contenido de ácido ascórbico**

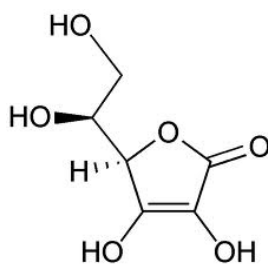
En general, el método de análisis preferido es HPLC debido a que proporciona una mayor selectividad que el método espectrofotométrico, de titulación o métodos enzimáticos; y dependiendo del tipo de técnica de detección empleada, el método HPLC es generalmente más sensible (Nováková y col., 2008).

El AA es un ácido orgánico con propiedades antioxidantes y actúa como un marcador de gran sensibilidad para detectar los cambios en la calidad de frutas y verduras durante el almacenamiento, procesamiento y transporte, ya que es altamente soluble en agua y vulnerable a la oxidación química y enzimática (Kristl y col., 2006). El AA es una de las especies menos estables entre otras vitaminas. Es muy sensible a la luz, al calor y al

## Resultados y discusión

---

aire, los cuales pueden estimular su oxidación. Es una vitamina vital para los seres vivos, ya que se requiere para varios procesos de desarrollo, enzimáticos y metabólicos, como estimular la síntesis del colágeno y funcionar como un compuesto anti-histamínico y anti-inflamatorio (Antonelli, y col., 2002). Su fórmula estructural se muestra en la figura 37.

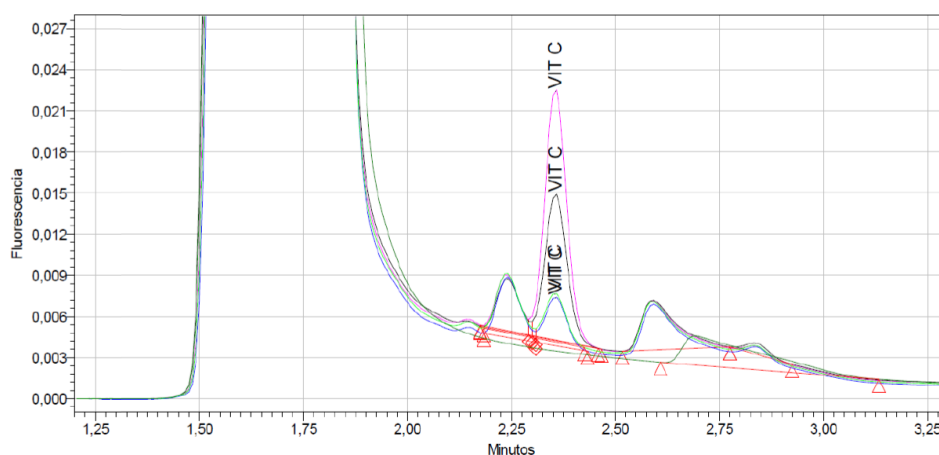


**Figura 37.** Estructura química del AA (*Frenich y col., 2005*)

El ácido L-ascórbico es la forma biológicamente activa del ácido ascórbico (Novakova y col., 2008). El AA es oxidado rápidamente a dehidroascórbico (DHA) a causa de los dos grupos hidroxilos en su estructura. Oxidaciones adicionales generan ácido dicetoglucónico, que no tiene ninguna función biológica y la reacción ya no es reversible. Las reacciones de oxidación se desencadenan por varios factores como aumento de temperatura, fluctuación severa del pH, presencia de oxígeno y/o metales ligeros y por acción enzimática (Teisser y col. 1996).

## Resultados y discusión

Luego de realizar la extracción y análisis del AA por HPLC de las distintas muestras de zanahorias, los resultados obtenidos revelan que las muestras a tiempo 0 presentan un contenido de AA de 3,5 mg/100 g de producto fresco (figura 38). Sin embargo, para las demás muestras almacenadas bajo refrigeración, no se detecta la presencia de AA, es decir, que el contenido de AA ya a los 3 días de almacenamiento, está por debajo del límite de detección del método (LDM), siendo este de 1 mg/100 g.



**Figura 38.** Cromatograma de muestras de zanahorias a tiempo 0 (línea verde y azul), y luego de 3 días de refrigeración, por duplicado y cuantificado por método de estándar externo con adiciones de 5 mg/100g (línea negra) y 10 mg/100g (línea rosa).

## Resultados y discusión

---

Los resultados demuestran que el contenido de AA inicial disminuyó al menos un 70% luego del almacenamiento de las muestras bajo refrigeración durante los primeros 3 días. Hay una pérdida del contenido de AA en todos los casos evaluados: rodajas de zanahorias de 5 mm de espesor almacenadas bajo refrigeración durante al menos 3 días, sin recubrir, recubiertas con solución formadora de film a base de Ch y Ch-Q, no pudiendo determinarse si existe o no un efecto protector de los recubrimientos evaluados. De existir cierto efecto beneficioso frente a la degradación del AA, éste se presentaría debajo del LDM.

Luego de analizar los resultados encontrados, podemos evaluar los factores claves que afectan el contenido de AA, favorecieron su descomposición.

Como se mencionó anteriormente, el AA es conocido por ser susceptible a la degradación por la luz. Iwase (2000) estudió el efecto de la luz natural y de la luz UV (265 nm) sobre la estabilidad de una solución de AA, a temperatura ambiente, con el fin de optimizar la elección del material de vidrio. Los resultados del ensayo demostraron que la degradación de AA se vio afectada tanto por la luz natural como por los rayos UV. Después de 1 h de ensayo, ya la concentración inicial de AA disminuyó a 79,7% bajo la influencia de luz UV. Bajo la influencia de la luz natural, la concentración inicial disminuyó aproximadamente un 15% y un 5% según se utilizaron frascos transparentes o de color marrón, respectivamente (Iwase, 2000).

## Resultados y discusión

---

La temperatura ha sido descrita como uno de los factores críticos que influye significativamente en la estabilidad de una solución de AA. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad del AA ha sido estudiado por varios investigadores (Nováková y col., 2008; Iwase, 2000; Gibbons y col., 2001; Chang y col., 2003) demostrando que a temperaturas más altas se confirma un alto grado de degradación de AA.

El AA exhibe una mayor estabilidad en soluciones ácidas. En estas condiciones, la formación de ascorbato, el principal producto de degradación, no se ve favorecida. En general, el pH ácido, de alrededor de 2,1, fue favorable para la preparación de la muestra, garantizando una suficiente estabilidad y recuperación de AA. El ácido meta-fosfórico (MPA) fue el extractante más ampliamente utilizado en numerosas publicaciones (Odriozola-Serrano y col., 2007; Kafkas y col., 2006; Karlesen y col., 2005; Romeu-Nadal y col., 2008; Romeu-Nadal y col., 2006); en algunas ocasiones se combinó con EDTA (Vovk y col., 2005) o con algún otro aditivo orgánico como metanol (Frenich y col., 2005)

La concentración de AA en solución podría también influenciar su estabilidad. Rumelin, Fauth y Halmágyi (1999), Iwase (2000) y Nováková y col. (2008) estudiaron la estabilidad del AA en soluciones de diferentes concentraciones. En todos los casos, se demostró que cuanto mayor sea la concentración, mejor es la estabilidad del antioxidante, disminuyendo de manera significativa a una concentración menor de 0,1 mg/l (Nováková y col., 2008).

## Resultados y discusión

---

Otro de los factores que pueden ayudar a minimizar las pérdidas de AA, es la presencia de agentes estabilizantes. Los mismos han sido utilizados para mejorar la estabilidad del AA. El MPA es capaz de cumplir con las funciones de extractante y estabilizante (Odriozola-Serrano y col., 2007; Kafkas y col., 2006; Karlesen y col., 2005; Chávez-Sevrin, 2008; Romeu-Nadal y col., 2006).

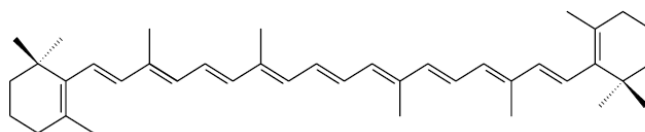
Considerando los factores que afectan la estabilidad del AA y según los resultados obtenidos, el contenido inicial de AA de las muestras evaluadas podría haber sido deteriorado principalmente por la incidencia de la luz, y en segundo lugar, por la baja concentración inicial presente en la muestra. Los demás factores, temperatura, pH y agentes estabilizantes, fueron controlados durante todo el proceso de extracción y cuantificación, ya que como se describió en *Materiales y Métodos*, durante todo el ensayo se trabajó a bajas temperaturas y se utilizó una solución de MPA garantizando un pH ácido y buenas condiciones extractoras y estabilizantes. Respecto de la baja concentración presente en la muestra, la zanahoria es una verdura que tiene un bajo contenido de AA en relación a otros vegetales frescos, que pueden oscilar desde 8,5 mg/100g para la lechuga hasta 105 mg/100g para el pimiento verde (Zaman y col., 2013), con lo cual, en nuestro caso, la baja concentración inicial de la muestra podría haber influenciado negativamente su estabilidad.

## Resultados y discusión

---

### IV.5.2.2. Determinación del contenido de $\beta$ -caroteno

Se sabe que los carotenoides desempeñan un papel importante más allá de sus funciones clásicas en la nutrición y la visión (Tee, 1988). Los carotenoides, ampliamente conocidos como provitamina A, presentan un interés creciente en su papel como antioxidantes (Bohm y col., 2002). La actividad anticancerígena y otros beneficios para la salud proporcionados por el  $\beta$ -caroteno (figura 39) incluyen la protección contra enfermedades cardiovasculares y la prevención de cataratas (Dietmar y col., 2001).



**Figura 39.** Estructura química del  $\beta$ -caroteno (Frenich y col., 2005)

Las zanahorias son una de las mejores fuentes de  $\beta$ -caroteno. El contenido de carotenos varía desde 60 a 120 mg/100 g, pero algunas variedades pueden contener hasta a 300 mg/100 g (Velisek, 1999). Siendo el  $\beta$ -caroteno aproximadamente el 80% de los carotenos presentes (Jeszka, 1997). La matriz de los alimentos afecta en gran medida la biodisponibilidad de los carotenoides, su eficiencia de conversión a vitamina A, o ambos (Tang y col., 2005). El procesamiento de los alimentos implica cambios en la integridad estructural de la matriz que produce efectos negativos (pérdida de

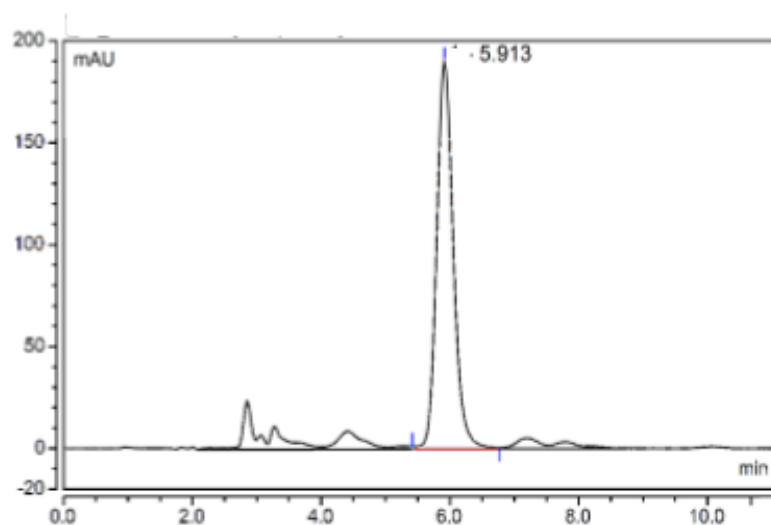


## Resultados y discusión

---

carotenoides debido a la oxidación) y efectos positivos (aumento de la biodisponibilidad). La luz, el calor, etc. favorecen la isomerización de los carotenoides; la degradación oxidativa, principal causa de grandes pérdidas de carotenoides, depende de la disponibilidad de oxígeno y es estimulada por factores tales como la luz (Fikselová y col., 2008).

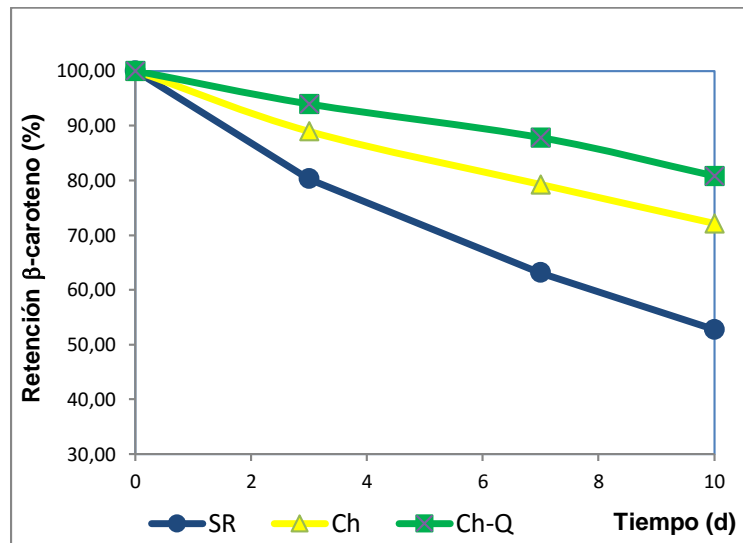
Luego de realizar la extracción y análisis de  $\beta$ -caroteno por HPLC de las distintas muestras (figura 40), los resultados obtenidos revelan que las muestras a tiempo = 0 d presentan un contenido de 82,5 mg/100 g de producto fresco.



**Figura 40.** Cromatograma de muestra de zanahoria a tiempo 0d.

## Resultados y discusión

Según los resultados obtenidos, el contenido de  $\beta$ -caroteno de las muestras de zanahorias mínimamente procesadas SR, Ch y Ch-Q disminuyó considerablemente luego de 10 días de almacenamiento a 4 °C (figura 40). Sin embargo, la retención de  $\beta$ -caroteno fue mayor en las muestras recubiertas con Ch-Q respecto de la muestra control, SR. A los 10 días, el contenido de  $\beta$ -caroteno fue de 66,7 mg/100 g (retención del 80,81%) y 59,5 mg/100 g (retención del 72,13%) para Ch-Q y Ch, respectivamente, comparado con 43,5 mg/100 g (retención 52,75%) para SR (tabla 21).



**Figura 401.** Porcentaje de retención de  $\beta$ -caroteno de zanahorias mínimamente procesadas almacenadas bajo refrigeración durante 10 días, SR (línea azul), Ch (línea amarilla), Ch-Q (línea verde).

## Resultados y discusión

**Tabla 21.** Contenido de  $\beta$ -caroteno (mg/100g) de las muestras de zanahorias SR, Ch y Ch-Q a los tiempos 0, 3, 7 y 10 días de almacenamiento bajo refrigeración

Tiempo (d)	Contenido $\beta$ -caroteno (mg/100g)		
	SR	Ch	Ch-Q
0	82,5	82,5	82,5
3	66,2	73,4	77,5
7	52,1	65,4	72,5
10	43,5	59,5	66,7

Analizando estadísticamente los resultados obtenidos, según un ANOVA general multifactorial, se obtiene que el recubrimiento aplicado sobre las muestras (factor *Tratamiento*) y tiempo de almacenamiento (factor *Tiempo*) tuvieron un efecto estadísticamente significativo (con un *valor-P* menor que 0,05) sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno con un 95% de confianza; no teniendo el factor *Repeticiones* influencia sobre la variable.

Al realizar un análisis estadístico a cada tiempo evaluado, se puede observar que los resultados del ANOVA, presentados en la tabla 22, demuestran que, durante todo el tiempo de almacenamiento, el recubrimiento aplicado sobre las muestras (factor *Tratamiento*) tuvo un efecto estadísticamente significativo (con un *valor-P* menor que 0,05) sobre el contenido de  $\beta$ -caroteno con un 95% de confianza; no teniendo el factor *Repeticiones* influencia sobre la variable.

## Resultados y discusión

**Tabla 22.** Análisis de Varianza para  $\beta$ -caroteno a los tiempos 3, 7 y 10 días de almacenamiento bajo refrigeración de las muestras con diferentes tratamientos (SR, Ch, Ch-Q)

<b>Tiempo (d)</b>	<i>Valor-P</i>	
	<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>
3	< 0,05	0,5864
7	< 0,05	0,1606
10	< 0,05	0,2027

Mediante el test LSD (tabla 23), se puede observar que a todos los tiempos evaluados, existen diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras, SR, Ch y Ch-Q. Resultando ser el tratamiento Ch-Q el más efectivo durante todo el tiempo de almacenamiento bajo refrigeración.

**Tabla 23.** Test LSD para contenido de  $\beta$ -caroteno (mg/100g) por Tratamiento aplicado a las muestras a los 3 tiempos evaluados. Se presentan los valores medios del contenido de  $\beta$ -caroteno y el valor de desviación estandar. Letras iguales no representan diferencias significativas

<b>Tratamientos</b>	<b>Tiempo (d)</b>		
	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>10</b>
<b>SR</b>	66,23 $\pm$ 0,11	52,10 $\pm$ 0,36	43,53 $\pm$ 0,35
<b>Ch</b>	73,40 $\pm$ 0,10	65,40 $\pm$ 0,20	59,53 $\pm$ 0, 11
<b>Ch-Q</b>	77,53 $\pm$ 0,47	72,46 $\pm$ 0,37	66,72 $\pm$ 0,34

## Resultados y discusión

---

Mediante la Prueba de Hipótesis se confirman los resultados encontrados en el ANOVA y el LSD. Se plantea como Hipótesis Nula ( $H_0$ ) que no hay diferencias entre las medias (diferencia entre medias = 0,0) y como Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ) que sí existen diferencias entre medias (las medias no son iguales). Como se muestra en la tabla 24, cuando el *Valor-P* es menor que 0,05, puede rechazarse la  $H_0$  con un 95,0% de nivel de confianza, es decir, en todos los casos sí se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.

**Tabla 24.** Test de Hipótesis para  $\beta$ -caroteno. Hipótesis Nula: diferencia entre medias = 0,0. Hipótesis Alternativa: diferencia entre medias  $\neq$  0,0

Contraste	<i>Valor-P</i>		
	Tiempo (d)		
	3	7	10
<b>Ch - Ch-Q</b>	$1,2067 \times 10^{-4}$	$8,9124 \times 10^{-6}$	$4,4669 \times 10^{-6}$
<b>Ch - SR</b>	$1,3745 \times 10^{-7}$	$6,1442 \times 10^{-7}$	$1,8977 \times 10^{-7}$
<b>Ch-Q - SR</b>	$2,2807 \times 10^{-6}$	$2,8905 \times 10^{-7}$	$1,3690 \times 10^{-7}$

Resultados similares fueron encontrados por Li y Barth (1998), donde evaluaron el contenido de  $\beta$ -caroteno sobre muestras de zanahorias mínimamente procesadas recubiertas con films a base de celulosa, envasadas y almacenadas bajo refrigeración. Luego de 28 días de almacenamiento se

## Resultados y discusión

---

obtuvo una retención de un 15% mayor para las muestras recubiertas en comparación con la muestra control sin recubrir.

Las posibles razones de las pérdidas de caroteno en las zanahorias durante el almacenamiento son la autooxidación, que se produce espontáneamente cuando se combina O<sub>2</sub> del aire con los carotenos, y la oxidación enzimática, la cual es catalizada por enzimas oxidativas (Gross, 1991). La estructura celular que protege a los carotenoides en la naturaleza limita su biodisponibilidad. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el procesamiento puede aumentar la biodisponibilidad de los carotenoides (Stahl y col., 1992; Roca y col., 1998; Van het Hof y col., 2000). La oxidación enzimática puede ocurrir antes de un tratamiento térmico, durante el pelado, troceado, trituración o fabricación de jugo o pulpa, con lo cual los alimentos mínimamente procesados son susceptibles de ser alterados (Azevedo-Meleiro y col., 2005a, b). La degradación oxidativa no enzimática se sabe que aumenta con la destrucción de la estructura celular del alimento, a mayor área superficial o porosidad, longitud y severidad de las condiciones de procesamiento, a mayor tiempo y temperatura de almacenamiento, así como con el uso de los envases permeables al oxígeno y la luz (Rodríguez-Amaya y col., 2006).

La abrasión de la superficie de la zanahoria que se produce en la etapa de pelado, expone al floema, donde hay mayor concentración de carotenos, al aire y a la luz, facilitando así la liberación de los carotenoides desde la matriz del alimento (Li y col., 1998).

## Resultados y discusión

---

Los recubrimientos comestibles sirven como una capa protectora y controlan la permeabilidad al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, disminuyendo así la autooxidación de los carotenos (Li y col., 1998). Diversos tratamientos con recubrimientos comestibles sobre vegetales producen un retardo en la respiración y el metabolismo (Nisperos-Carriedo y col., 1988; Bender y col., 1993; Park y col., 1994), indicando que la actividad de las enzimas implicadas en la oxidación de carotenos puede ser suprimida o bien, el sustrato (O<sub>2</sub>) está limitado por la aplicación de estos recubrimientos. Esto puede conducir a la disminución de pérdidas de caroteno en las zanahorias recubiertas durante el almacenamiento frente a las muestras SR (Li y col., 1998).

## Conclusiones

---

### V. CONCLUSIONES



## Conclusiones

---

### V. CONCLUSIONES

- Respecto de la caracterización del Ch nativo de bajo PM, la determinación de %DGA del Ch nativo por las dos técnicas evaluadas (titulación potenciométrica y espectroscopía IR) permitieron determinar que no se encontró una desviación sistemática método dependiente en los diferentes valores encontrados de % GDA para el Ch nativo, mostrando una gran correspondencia entre los resultados obtenidos. Los valores hallados correspondientes al PM del Ch nativo por el método viscosimétrico y SEC presentaron una diferencia menor al 10%, con lo cual se puede validar el método viscosimétrico como técnica de caracterización.
- Se logró modificar enzimáticamente la Q, por oxidación biológica usando la enzima CPO, y formar el aducto Ch-Q, logrando una eficiencia de reacción mayor al 50%. La formación de la correspondiente *o*-quinona pudo observarse a través de los cambios producidos en el espectro de absorción característico de la Q.
- El Ch derivatizado con Q mostró una mayor capacidad antioxidante que la presentada por la molécula de Ch nativo, frente a ambas especies radicalarias evaluadas ( $O_2^{\cdot-}$  y  $\cdot OH$ ), siendo el %D

## Conclusiones

---

dependiente de la concentración ensayada. El mayor poder desactivante de la molécula de Ch-Q se obtuvo a la máxima concentración (0,44 mg/ml) frente al radical  $O_2^{\cdot-}$ .

- La obtención de los films a base de Ch-Q se realizó utilizando la misma metodología (concentración y ácido utilizado para disolver la molécula, tiempo de disolución, tiempo y temperatura de centrifugado y secado) que la utilizada para preparar el film a base de Ch nativo, garantizando de esta manera que el método de preparación no influyó sobre las características del film obtenido.
- Las propiedades físico-químicas de los films a base de Ch se vieron afectadas de manera significativa con la incorporación del flavonoide Q. Esta incorporación supuso una mejora en las propiedades barrera frente al  $O_2$  y  $CO_2$ , resultando los valores de permeabilidad, comparables a los que presentan los polímeros sintéticos destinados al envasado de alimentos. Si bien los resultados de WVP son comparables a los valores que muestran otros films a base de Ch, éstos no son lo suficientemente bajos como para evitar la pérdida de humedad del vegetal. El espesor y densidad del film también se vieron modificados por la mayor compactación en la estructura de la película. En cuanto a las propiedades ópticas, se observó una disminución en la transparencia y un aumento en la opacidad,

## Conclusiones

---

logrando un mayor efecto fotoprotector sin afectar el valor comercial del producto recubierto dado la intensidad de color que presenta el producto analizado.

- La formación del aducto Ch-Q afectó las propiedades mecánicas de las películas, como así también la afinidad con el agua. El incremento en TS responde a la existencia de interacciones entre la matriz de Ch y la Q que provocó el fortalecimiento de las películas, desarrollando una estructura polimérica más rígida. Mientras que el aumento en la solubilidad y humedad del film provocó un incremento en la elasticidad del film; sin embargo, este efecto se vio reducido por el aumento en el grado de reticulación del polímero.
- Los resultados microbiológicos *in vitro* obtenidos indican que los films biodegradables a base de Ch y Ch-Q, con una concentración del 1% (p/v), son una alternativa viable en el control de los microorganismos evaluados; obteniéndose una reducción del 100% ya en la primera hora de contacto con el film a base de Ch-Q para *S. aureus* y *E. coli*. Respecto de los films biodegradables a base de Ch-Q, se obtuvo un mayor %R de forma instantánea, para ambos microorganismos, comparado a los films a base de Ch nativo, siendo más sensible a la capacidad antimicrobiana el *S. aureus*. Se puede

## Conclusiones

---

concluir que los recubrimientos evaluados podrían actuar como una barrera viable frente al control de microorganismos patógenos.

- Las películas a base de Ch modificado, presentaron una mayor capacidad antioxidante frente a las EROS  $O_2^{\bullet-}$  y  $\bullet OH$  que las obtenidos a base de Ch nativo. Además, presentan una diferencia positiva en el %D de  $O_2^{\bullet-}$  que es aproximadamente el doble que la mostrada para el  $\bullet OH$ , resultando más adecuadas para la aplicación en recubrimiento de vegetales procurando la estabilidad oxidativa de los mismos.
- La aplicación de los recubrimientos a base de Ch-Q son una alternativa viable para mejorar la calidad postcosecha de las zanahorias mínimamente procesadas. Se logró controlar la microbiota presente en el vegetal, demostrando tener, la incorporación de Q, un efecto sinérgico con el Ch. También se obtuvo una disminución de la pérdida de  $\beta$ -caroteno durante el almacenamiento bajo refrigeración por la limitada disponibilidad de  $O_2$  debido a la reducción de la  $O_2P$  y la mayor capacidad antioxidante mostrada por los films; y por su efecto fotoprotector relacionado a la menor transparencia de los mismos en la región visible. Sin embargo, el contenido de AA sufrió

## Conclusiones

---

una disminución de al menos 70%, no pudiéndose determinar si algún tratamiento tuvo efecto protector sobre esta vitamina.

- Los films a base de Ch-Q presentan un alto potencial para ser utilizados como material de embalaje complementario a los materiales sintéticos para recubrir zanahorias mínimamente procesadas, en combinación con otros tipos de control, como ser la calidad de la materia prima, condiciones adecuadas de procesamiento y temperaturas óptimas de almacenamiento. Además, es imprescindible estudiar y evaluar aspectos relacionados con el escalado, como forma de aplicación, apilamiento, etc.
- A través de la información obtenida en este trabajo de tesis doctoral, fue posible establecer consideraciones generales respecto del comportamiento de los recubrimientos a base de Ch-Q sobre la calidad postcosecha de zanahorias mínimamente procesadas. No obstante, es posible continuar trabajando a fin de optimizar algunas propiedades, como la permeabilidad al vapor de agua.

## Bibliografía

---

### **VI. BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

---

### VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Bary, E. M. (2003). Applications of Plastics Films in Packaging. Cap. 9. Handbook of plastics films. Ed. Rapra Technology Limited. pp 245.
- Abdollahi, M., Rezaei, M. y Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering* 111, 343–350.
- Aberg, C.M., Chen, T. y Payne, G. F. (2002). Renewable Resources and Enzymatic Processes to Create Functional Polymers: Adapting Materials and Reactions from Food Processing. *Journal of Polymers and the Environment*, 10, 77-84.
- Adour, L., Arbia, W., Amrane, A. y Mameri, N., Combined use of waste materials – Recovery of chitin from shrimp shells by lactic acid fermentation supplemented with date juice waste or glucose, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1664–1669.
- Agulló E, Gschaider ME, Rodríguez MS, Ramos VM y Pedroni V. (1998). Efecto antifúngico de películas de quitosano sobre prepizzas. *Inform Tecnol* 9, 123-128.
- Aherne, S.A. y O'Brien N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18, 75-81.
- Ahmed, S y Ikram, S. (2015). Chitosan & its derivatives: a review in recent innovations. *IJPSR*, 6, 14-30.
- Ahvenainen, R. (1996). New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends Food SciTechnol*, 7,179–187.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837–842.
- Aked, J. (2000). Fruits and vegetables. In: Kilcast D, Subramaniam P, editors. *The stability and shelf-life of food*. Boca Raton, Fla.: Woodhead Publishing Ltd. and CRC Press LLC. p 249–278.
- Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC y Shahidi F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agric Food Chem* 49, 1410–1416.

## Bibliografía

---

- Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Schera, J y Muniglia, Lionel. (2015). Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 112, 25–39.
- Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J. y Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydr. Polym.* 87, 537–544.
- Allan, C. R. y Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3, 285-287.
- Altiok, D., Altiok, E., y Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2227–2236.
- Alzamora, S.E., Tapia, M.S. y López-Malo, A. (2000). *Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspect and Applications*. Aspen Pub. Co., Inc., Maryland, US, 277-286.
- Anker, M., Stading, M. y Hermansson, A.-M. (1999). Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1878–1886.
- Antonczak, S., Fiorucci, S., Golebiowski, J. y Cabrol-Bass, D. (2009). Theoretical investigations of the role played by quercetinase enzymes upon the flavonoids oxygenolysis mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 1491–1501.
- Antonelli, M. L., Ascenzo, G. D., Laganà, A. y Pusceddu, P. (2002). Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. *Talanta*, 58, 961-967.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. y Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.
- Arancibia, M., Rabossi, A., Bochicchio, P.A., Moreno, S. y col. (2013). Biodegradable Films Containing Clove or Citronella Essential Oils against the



## Bibliografía

---

- Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Agric. Food. Tech.*, 3, 1-7.
- Arayne, M.S., Bibi, Z. y Sultana, N. (2009). Rapid and specific spectrophotometric and RP-HPLC methods for the determination of ascorbic acid in fruits juices and in human plasma. *J. Chem. Soc. Pak.* 31, 402-407.
- Arbia, W., Arbia, L., Adour, L. y Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 51 (1) 12–25.
- Arcan, I. y Yemenicioglu, A. (2011). Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International*, 44, 550-556.
- Arias, G.P., Stashenko, E. y Torres, R. (2007). Biotransformación de terpenos R(+)-limoneno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -terpineno por medio de cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. *Scientia et Technica Año XIII*, 33, 75-78.
- Arthur, C., Baker, J. y Bamford, H. (2009). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. Sept 9-11, 2008. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NOS-OR&R-30.
- Asociación Internacional de Productores de Alimentos Frescos Cortados (IFPA). (1999). *Fresh-Cut Produce Handling Guidelines*, 3rd edn. Newark, NJ: Produce Marketing Association, pp 39.
- Assoc. Plast. Manuf. Eur. (APME). *An Analysis of Plastics Production, Demand and Recovery in Europe*. 2006.
- Assunção, R. B. y Mercadante, A. Z. (2003). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. *Food Chemistry* 81, 495–502.
- ASTM D-1434-82. *Standard Test Method for Determining Gas Permeability Characteristic of Plastic Film and Sheeting*. 2009.
- ASTM D-882. *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. 2002.
- ASTM D-96. *Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials*. 2005.

## Bibliografía

---

- ASTM E-2149. Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. 2001.
- ASTM E96 (1995). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. American Society for Testing and Materials.
- Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 406-413.
- Aye, K.N., Karuppuswamy, R., Ahamed, T. y Stevens, W.F. (2006). Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresour. Technol.* 97, 577–582.
- Ayranci E. y Tunc S. (2004). The effect of edible coatings on water and vitamin C loss of apricots and green peppers. *Food Chem.* 87, 339.
- Ayranci, E. y Tunc, S. (2003). A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh foods. *Food Chemistry* 80, 423–431.
- Aytekin, A.O., Morimura, S. y Kida K., (2011). Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 212–216.
- Aytekin, O. y Elibol, M. (2010). Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirae* for biological chitin extraction from prawn waste, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33, 393–399.
- Azevedo-Meleiro, CH. y Rodriguez-Amaya, D.B. (2005a). Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. *J Sci Food Agric* 85, 591-597.
- Azevedo-Meleiro, CH. y Rodriguez-Amaya, D.B. (2005b). Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *J Food Comp Anal* 18, 845-855.
- Bajaj KL, Kaur, G. y Sukhija, B.S. (1980). Chemical composition and some plant characteristics in relation to quality of some promising cultivars of carrot (*Daucus carota* L.). *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 30, 97–107.

## Bibliografía

---

- Balázs N. y Sipos P. (2007). Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosans. *Carb. Res.*, 342, 124–130.
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Chen X. y Hagenmaier, R.D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biol Technol* 9, 151–63.
- Baldwin, E.A. (1994). Edible coatings for fresh fruits and vegetables: past, present and future. Eds. J.M. Krochta; E.A. Baldwin; M.O. Nisperos- Carriedo, Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, U.S.A., 24-64.
- Bangyekan, C., Aht-Ong, D. y Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 63, 61–71.
- Banker, G.S., Gore, A.Y. y Swarbrick, J. (1966). Water vapour transmission properties of free polymer films. *J. Pharm. Pharmacol.* 18, 457–466.
- Barnes, D.K.A y Milner, P. (2005) Drifting plastic and its consequences for sessile organism dispersal in the Atlantic Ocean. *Marine Biology* 146:815-825.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C. y Barlaz, M. (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 364:1985-1998.
- Barry-Ryan, C. y O’Beirne, D. (2000). Effects of peeling methods on the quality of ready-to-use carrot slices. *Int J Food Sci Technol* 35, 243–254.
- Bautista, J., Jover, M., Gutierrez, J.F., Corpas, R., Cremades, O., Fontiveros, E. y col., Preparation of crayfish chitin by in situ lactic acid production, *Process Biochem.* 37, 229– 234.
- Baxter, A, Dillon, M., Anthony Taylor, K.D. y Roberts, G.A.F. (1992). Improved method for I.R. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *I J Biol Macromol*, 14, 166-169.
- Bedia, E.L., Murakami, S., Kitade, T. y Kohjiya, S. (2001). Structural development and mechanical properties of polyethylene naphthalate/ polyethylene terephthalate blends during uniaxial drawing. *Polymer*, 42, 7299-7305.
- Beecher, G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition* 133, 3248S-3254S.

## Bibliografía

---

- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R. y Reyes, J.E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering* 110, 232–239.
- Bender, R.J., Brecht, J.K., Sargent, S.A., Navarro, J.C. y Campbell, C.A. (1993). Ripening initiation and storage performance of avocados treated with an edible-film coating. *Acta Hort.* 343, 184.
- Berghoff, C. F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo. Tesis doctoral. UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2769>.
- Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T., & Rollings, J. E. (1993). Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. *Carbohydrate Research*, 238, 11–26.
- Bhaskar, S., Kumar, K.S., Krishnan, K. y Antony, H. (2013) Quercetin Alleviates Hypercholesterolemic Diet Induced Inflammation during Progression and Regression of Atherosclerosis in Rabbits. *Nutrition*, 29, 219-229.
- Bhat, S. (2013). Minimal Processing and Preservation of Fruits and Vegetables by Active Packaging. *International Journal of Herbal Medicine*. 1, 131-138.
- Bifania, V., Ramírez, C., Ihl, M., Rubilar, M., García, A. y Zaritzky, N. (2007). Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films. *LWT* 40, 1473–1481.
- Bioavailability of b-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr* 128, 913-916.
- Blinkovsky, A.M. y Dordick, J.S. (1993). Peroxidase-catalyzed synthesis of lignin-phenol copolymers. *J Polym Sci* 31:1839–1846.
- Block, G. (1994) Nutrient source of pro-vitamin A carotenoids in American diet. *Am J Epidemiol* 139, 290–293.
- Bohm V., Putpitassari-Nienaber N.L., Ferruzzi M.G. y Schwartz S.J. (2002). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alfa-carotene, beta-carotene, lycopene and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 221–226.

## Bibliografía

---

- Bonilla, J. Atarés, L. Vargas, M. y Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *J. Food Eng.* 110, 208–213.
- Boots, A.W., Kubben, N., Haenen, G.R. y Bast, A. (2003) Oxidized Quercetin Reacts with Thiols Rather than with Ascorbate: Implication for Quercetin Supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 308, 560-565.
- Bordeau, S. y Scarpa, J. (2000). *Análisis químico del vino* (2nd ed.). Santiago, Chile: Universidad Católica de Chile. p. 219-221
- Bors, W., Heller, W., Christa, M. y cols. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186:343-355.
- Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M.R., Avides, M. C., Quintas, M. A.C., Vicente, A. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan-based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering* 106: 111-118.
- Bozic, M., Gorgieva, S. y Kokol V. (2012). Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydr. Polym.*, 89, 854-864
- Bozic, M., Gorgieva, S. y Kokol V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydr. Polym.*, 87, 2388–2398
- Brecht JK, Felkey K, Bartz JA, Schneider KR, Saltveit ME. y Talcott, S.T. (2004). Fresh-cut vegetables and fruits. *Hort Rev* 30, 185–251.
- Brecht, J.K. (1995). Physiology of lightly processed fruits and vegetables in lightly processed fruits and vegetables. *Hort. Sci.* 30, 18.
- Brown, W.E. (1992). *Plastics in Food Packaging: Properties, Design and Fabrication*. Marcel Dekker, Inc., New York (pp. 66–102).
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S. y col. (2008) Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.) *Environmental Science & Technology* 42, 5026-5031.

## Bibliografía

---

- Brugnerotto, J., Desbrières, J., Roberts, G. y Rinaudo, M. (2001). Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*, 42, 9921- 9927.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., y Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569–3580.
- Brzonova, I., Steiner, W., Zankel, A., Nyanhongo, G. S. y Guebitz, G.M. (2011). Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79, 294–303.
- Buick, R. K. y Damoglou, A. (1987). The effect of vacuum packaging on the microbial spoilage and shelf-life of ready-to-use sliced carrots. *Journal Science Food Agriculture*, 38, 167–175.
- Burda S. y Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774–2779.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Buzinova, D. A. y Shipovskaya, A. B. (2008). Sorption and bactericide properties of chitosan films. *Izvestya of Saratov University*, 8 (2). DOI:547.458:544.723.
- Byun, Y., Kim, Y. T. y Whiteside, S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with  $\alpha$ -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100, 239-244.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Campos-Terán, J., Iñárritu, I, Aburto, J. y Torres, E. (2013). Enhanced functionality of peroxidases by its immobilization at the solid–liquid interface of mesoporous materials and nanoparticles. Cap.16. *Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science*, First Edition. Edited by Juan M. Ruso and Ángel Piñeiro. Published by John Wiley & Sons, Inc. 335-351.

## Bibliografía

---

- Carlstrom, D. (1957). The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-d-glucosamine). *J. Biophys Biochem Cytol.* 3, 669-683.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Souza, M. P., Teixeira, J. A. y Vicente, A. A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering.* 95, 379–385.
- Casariogo, A., Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., Cruz, L., Díaz, R. y Vicente, A.A. (2009) Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids* 23, 1895–1902.
- Casariogo, A., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Cruz, L. y Díaz R. (2008). Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids* 22, 1452–1459.
- Casella, L., Poli, S., Gullotti, M., Selvaggini, C., Beringhelli, T. y Marchesini, A. (1994). The chloroperoxidase-catalyzed oxidation of phenols. Mechanism, Selectivity, and Characterization of Enzyme-Substrate Complexes. *Biochemistry* 33, 6377-6386.
- Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A. y Vicente, A. A. (2012) Effects of Interactions between the Constituents of Chitosan-Edible Films on Their Physical Properties. *Food Bioprocess Technol* 5, 3181–3192.
- Chang, H. Y., Chen, J. J., Fang, F. y Chen, Z. (2004). Enhancement of antibody response by chitosan, a novel adjuvant of inactivated influenza vaccine. *Chinese Journal of Biologicals*, 17, 21-24.
- Chang, K.L.B. y Tsai, G. (1997). Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melanthro*) shell waste, *J. Agric. Food Chem.* 45, 1900–1904.
- Chang, M.L. y Chang, C.M. (2003). Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. *J Pharm Biomed Anal.* 33, 617-626.

## Bibliografía

---

- Chávez-Sevrin, J.L., Castellote, A.I., Rivero, M. y Lopes-Sabater, M.C. (2008). Analysis of vitamins A, E and C, iron and selenium contents in infant milkbased powered formula during full shelf life. *Food Chem.* 107, 1187-1197.
- Chen, L., Du, Y. y Zeng, X. (2003). Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. *Carbohydrate Research*, 338, 333–340.
- Chen, L., Du, Y., Tian, Z. y Sun, L. (2005). Effect of the degree of deacetylation and the substitution of carboxymethyl chitosan on its aggregation behavior. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43, 296–305.
- Chervin, C. y Boisseau, P. (1992). Quality maintenance of ready-to-eat shredded carrots by gamma irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 2, 7–17.
- Chillo, S., Flores, S., Mastromatteo, M., Conte, A., Gerschenson, L. y Del Nobile, M.A., (2008) Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *J. Food Eng.* 88 159–168.
- Chin, A.W. (2010). *Polymers for Innovative Food Packaging. An Interactive Qualifying Project Report.* Faculty of Worcester Polytechnic Institute. p 1-55.
- Cho, Y.I., No, H.K. y Meyers, S.P. (1998). Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products, *J. Agric. Food Chem.* 46, 3839– 3843.
- Choorit, W., Patthanamane, W. y Manurakchinakorn, S. (2008). Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells, *Bioresour. Technol.* 99, 6168–6173.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. y Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery, *Process Biochem.* 37, 1359–1366.
- Cirillo, G. y Lemma, F. (2012). *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications.* Scrivener Publishing. ISBN 978-1-118-20854-0. Cap. 5.4.4 Chitosan containing phenolic compounds.
- Cisneros-Zevallos, L. y Krochta, J.M.. (2003). Dependence of Coating Thickness on Viscosity of Coating Solution Applied to Fruits and Vegetables by Dipping Method. *J Food Sci* 68, 503–510.



## Bibliografía

---

- Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B. y cols. (1998). Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. Alan R Liss, New York.
- Coles, R. (2003). Introduction. In: Coles R, McDowell D, Kirwan MJ, editors. Food packaging technology. London, U.K.: Blackwell Publishing, CRC Press. p 1–31.
- Coma, V., Deschamps, A. y Martial-Gros, A. (2003). Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer—Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants, *Journal of Food Science*, 68, 2788-2792.
- Corbett, M. y Chipko, B. (1979). Peroxide oxidation of indole to oxindole by chloroperoxidase catalysis. *J. Biochem.* 183, 269-276.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. y Berghe D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, 61, 71–76.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 569-590.
- Couto, S.R., Sanroman, M. y Gubitz, G.M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsute*. *Chemosphere* 58, 417–422.
- Craft, N.E. y Soares, J. H. (1992). Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and  $\beta$ -Carotene in Organic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* 40, 431-434.
- Cunha, T., Teixeira, B., Santos, B., Almeida, M., Dias, G. y das Neves, J. (2012). Biological and Pharmacological Activity of Chitosan and Derivatives. Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics, First Edition. Ed. by Bruno Sarmiento and José das Neves. Cap. 5, 75-92.
- Cuq, B, Gontard, N., Cuq, J.L. y Guilbert, S. (1996). Functional Properties of Myofibrillar Protein-based Biopackaging as Affected by Film Thickness. *Journal of Food Science.* 61, 580-584.

## Bibliografía

---

- Curcio, M., Puoci, F. , Lemma,F.,Parisi,O.I.,Cirillo,G.,Spizzirri,U.G., y col.(2009). Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,57, 5933-5938.
- Cushnie, T. P. T., y Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.
- Da Silva EA, Vieira MA, Vieira EA, Amboni RDMC, Amante ER y Teixeira E. (2007). Chemical, physical and sensory parameters of different carrot varieties (*Daucus carota* L.). *J Food Process Eng* 30, 746–756.
- D'Abrosca, B. y col. (2007). "Limoncella" apple, an Italian apple cultivar: phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry* 104, 1333-1337.
- Dajas, F. (2012) Life or Death: Neuroprotective and Anticancer Effects of Quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 383-396.
- Darmadji, P. y Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38, 243–254.
- Dass, C.R. y Choong, P.F. (2008) The use of chitosan formulations in cancer therapy. *J. Microencapsul.*, 25, 275–279.
- Davies, R. y Frahn, J.L. 1977. Addition of primary aliphatic amines to 1,2-benzoquinone. The absence of reaction between a secondary amide and 1,2-benzoquinone. *J Chem Soc, Perkin Trans I* 89, 2295–2297.
- Day, BPF. (1994). *Modified Atmosphere Packaging and Active Packaging of Fruits and Vegetables in Minimal Processing of Foods (VJT Symposium Series 142)*.
- Day, BPF. (2001). Active packaging – a fresh approach. *Brand c – the journal of brand technology*, 1, 32–41.
- Debeaufort F, Quezada-Gallo JA. y Voilley A. (1998). Edible films and coatings: tomorrows packagings: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38, 299–313.
- Del Nobile M.A., Conte A., Cannarsi M. y Sinigaglia M. (2008). Use of biodegradable films for prolonging the shelflife of minimally processed lettuce. *J. Food Eng.* 85, 317.
- Del Nobile M.A., Conte A., Scrocco C., Brescia I., Speranza B., Sinigaglia M., Perniola R. y Antonacci D. (2009). A study on quality loss of minimally process grapes as affected by film packaging. *Postharv Biol. Technol.* 51, 21.

## Bibliografía

---

- Demolliens, A., Boucher, C., Durocher, Y., Jolicoeur, M., Buschmann, M. D. y De Crescenzo, G. (2008). Tyrosinase-Catalyzed Synthesis of a Universal Coil-Chitosan Bioconjugate for Protein Immobilization. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 1849-1854.
- Denuzière, A., Yagoubi, N., Baillet, A., y Ferrier, D. (1995). An improved statistical parameter allowing elaborate comparison of polymer molecular weight distribution by gel filtration chromatography: Application to chitosan. *S.T.P. Pharmaceutical Science*, 5, 481–485.
- Derraik, J.G.B. (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 44:842-852.
- Desentis-Mendoza, R.M. y col. (2006) Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* 7, 1845–1854.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A.E., Masi, P. y Porta, R. (2006). Chitosan–whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules* 7, 744–749.
- Dietmar E.B. y Bamedi A. (2001). Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on cryptoxanthin esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2064–2067.
- DiGangi, J., Blum, A., Bergman, A. y col. (2010) San Antonio Statement on Brominated and Chlorinated Flame Retardants *Environmental Health Perspectives* 118, 516-518.
- Dixon, R.A. y col. (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165, 9–28.
- Dominguez, X.A., Sanchez, H., Suarez, M., Baldas, J.H., Gonzalez, M.R. (1989). Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica*, 55: 208-209.
- Donhowe, I.G. y Fennema, O.R. (1993). The effects of solution composition and drying temperature on crystallinity, permeability and mechanical properties of methylcellulose films. *J. Food Process. Preserv.* 17, 231–246.

## Bibliografía

---

- Du, J., Gemma H. e Iwahori, S. (1998). Effects of chitosan coating on the storability and on the ultrastructural changes of 'Jonagold' apple fruit in storage. *Food Preserv Sci* 24, 23-29.
- Dugas, A.J., Castañeda-Acosta, J., Bonin, J.C., Price, K. L., Fischer, N. H., y Winston, G. W. (2000). Evaluation of the Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure–Activity Relationships. *J. Nat. Prod.*, 63 (3) 327–331.
- Duran, N. y Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environ.* 28, 83–99.
- Durango, A. M., Soares, N. F. F. y Andrade, N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control.* 17, 336–341.
- Dutta, P.K., Dutta, J. y Tripathi, V.S. (2004). Chitian and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20–31.
- Elsabbe, M. Z. y Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering C* 33, 1819–1841.
- EPA. (1989). The solid waste dilemma: An agenda for action. EPA530-SW-89-019. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- EPA. Environmental Protection Agency (U.S.). (2006). *Plastics*. Washington, D.C.: EPA. <http://www.epa.gov/epaoswer/non-hw/muncpl/plastic.htm>.
- Espín, G. (2007). *Plásticos y contaminación ambiental*. Academia de Ciencias de Morelos, A.C. 30.
- Fabra, M. J., Talens, P. y Chiralt, A. (2010). Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids*, 24, 384-391.
- Faes, E. (2015). *Polyestirene (PS)*. *Plastics Europe*. Association of Plastics Manufacturers. <http://www.plasticseurope.org/>
- Faller, A.L.K. y Fialho, E. (2009). The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Res Int* 42, 210–215.

## Bibliografía

---

- Fang, S. W., Li, C. F., y Shih, D. Y. C. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of Food Protection*, 56, 136–140.
- FAO. (1989). Parte II: Control de calidad, almacenamiento y transporte. In FAO, *Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas* (O. R. Caribe, Trans., pp. 1-87). Santiago, Chile: Regional Office for Asia and the Pacific (RAPA), FAO and the Association of Food Marketing Agencies in Asia and the Pacific (AFMA).
- Feng, J., Zhao, L. y Yu, Q. (2004) Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 317, 414–420.
- Ferguson I., Volz R, Woolf A y Cavalieri, RP. (1999). Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biol Technol* 15:255–62.
- Fernández Cervera, M., Heinamaki, J., Rasanen, M., Maunu, S.L., Karjalainen, M., Nieto Acosta, O.M., Yliruusi, J. (2004). Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin. *Carbohydrate Polymers*, 58, 401–408.
- Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E. y Riguera, R. (2005). Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR. *Carbohydrate Polymer*, 61, 155–161.
- Fernandez-Saiz, P., Ocio, M.J. y Lagaron, J.M. (2006) Film-Forming Process and Biocide Assessment of High-Molecular-Weight Chitosan as Determined by Combined ATR-FTIR Spectroscopy and Antimicrobial Assays. *Biopolymers*. 83, 577–583.
- Fernández, M. (2015). Poliolefinas. *Plastics Europe*. Association of Plastics Manufacturers. <http://www.plasticseurope.org/>
- Fikselová, M., Silhár, S., Mareček, J. y Frančáková, H. (2008). Extraction of Carrot (*Daucus carota* L.) Carotenes under Different Conditions. *Czech J. Food Sci.* 26, 268–274.
- Fiorucci, S., Golebiowski, J., Cabrol-Bass, D. y Antonczak, S. (2007). DFT Study of Quercetin Activated Forms Involved in Antiradical, Antioxidant, and Prooxidant Biological Processes *J. Agric. Food. Chem.* 55, 903–911.

## Bibliografía

---

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (1989). Prevention of post-harvest food losses: fruits, vegetables, and root crops. A training manual. Rome, Italy: FAO. Code: 17, AGRIS: J11.
- Formica J.F. y Regelson W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Tox.* 33, 1061–1080.
- Francesko, A. y Tzanov, T. (2011). Chitin, chitosan and derivatives for wound healing and tissue engineering, in *Biofunctionalization of Polymers and Their Applications*, G. S. Nyanhongo, W. Steiner, and G. Gübitz, Eds., vol. 125 of *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, pp. 1–27, Springer, Berlin, Germany.
- Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, Murphy SP, (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruit and vegetables consumed in Hawaii. *J. Food Compos. Anal.* 17, 1-35.
- Fras-Zemljic, L., Kokol, V. y Cakara, D. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. *Text. Res. J.*, 81, 1532–1540.
- Frenich, A.G., Torres, M.E.H., Vega, A.B., Vidal, J.L.M. y Bolaños, P.P. (2005). Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7371-7376.
- Frost, P. (2005). Packaging Council of Australia INC, PCA. Australian packaging: issues and trends. <http://www.pca.org.au/>
- Fung, A. L. (2007). A study on the characteristics of chitosan as an immobilization matrix for biosensors. Universiti Sains Malaysia. Tesis M. Sc.
- Galgano, F., Condelli, N., Favati, F., Di Bianco, V., Perretti, G. y Caruso, M.C. (2015). Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Ital. J. Food Sci.*, 27, 1-20.
- Galloway T., Cipelli R., Guralnik J. y col. (2010) Daily Bisphenol A Excretion and Associations with Sex Hormone Concentrations: Results from the InCHIANTI Adult Population Study. *Environmental Health Perspectives* 118, 1603-1608.
- García Bermejo A. B. y col. (2012). Effect of drying methods on the reactivity of chitosan towards Maillard reaction. *Food Hydroc.* 29: 27-34.

## Bibliografía

---

- García, A.E.Z. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 21,178-185.
- García, J. M., Herrera, S. y Morilla, A. (1996). Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 30-33.
- García, M.A. (2008). Películas y cubiertas de quitosana en la conservación de vegetales. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 18, 71-76.
- García, M.A., Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. (2000). Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Edible Starch-based Films and Coatings. *J. Food Sci.* 65, 941–947.
- Garg, N., Churey, J. J. y Splittstoesser, D. F. (1990). Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal Food Protection*, 53, 701–703.
- Garret, E. (1994). Challenges and Opportunities in Marketing Fresh-cut Produce in Modified Atmosphere Food Packaging (Brady, A.L., ed.), pp. 31-34, Institute of Packaging Professionals, Herndon, VA, USA.
- Garrigos, M.C., Marin, M.L, Canto, A. y Sanchez, A. (2004). Determination of residual styrene monomer in polystyrene granules by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1061, 211-216.
- Gartner, C. y López, B. L. (2010). Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia* N.º 53 pp. 20-29.
- Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L. y Testin, R.F. (1993). Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1835–1839.
- George, J., Kumara, R., Sajeevkumara, V.A. y col. (2007). Effect of gamma-irradiation on commercial polypropylene based mono and multi-layered retortable food packaging materials. *Radiation Physics and Chemistry*, 76, 1205–1212.
- Gibbons, E., Allwood, M.C., Neal, T. y Hardy, G. (2001). Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, 605-611.

## Bibliografía

---

- Gliszczynska-Swiglo, A., van der Woude, H., de Haan, L., Tyrakowska, B., Aatrs, J. M. M. J. G. y Rietjens, I. M. C. M. (2003) The role of quinone reductase (NQO1) and quinone chemistry in quercetin cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro* 17, 423-431.
- Global Industry Analysts (2011) *Molded Plastics: A Global Strategic Business Report*. Global Industry Analysts Inc.
- Gnanasambadam, R., Hettiarachchy, N. S. y Coleman, M. (1997). Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science*, 62, 395-398.
- Golan, E., Krissoff, B., Kuchler, F., Calvin, L., Nelson, K. y Price, G. (2004). Traceability in the U.S. food supply: economic theory and industry studies. Agricultural economic report nr 830. Washington, DC: Economic Research Service, U.S. Dept. of Agriculture. p 48.
- Gómez-Estaca, J., Gimenez, B., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92, 78-85.
- Gómez-Estaca, J., Gimenez, B., Montero, P. y Gómez-Guillén, M.C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*. 92, 78-85.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A. y Montero, P. (2007). Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). *Food Hydrocolloids*, 21, 1133-1143.
- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.-L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science* 57 (1), 190–195.
- González-Peña Fundora, D., Falcón Rodríguez, A., Gómez Izaguirre, G. y Fernández Morales, A. (2013). La quitosana: potencialidades antimicrobianas contra hongos y Oomycetes. *Fitosanidad*. 17, 111-115.
- Gooday, G.W. (1990). The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology*, ed. K.C. Marschall, New York. Academic Press. 387-440.
- Goosen, M. F. A. (1997). *Applications of chitin and chitosan*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., Inc.



## Bibliografía

---

- Gregory, M.R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings – entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 364, 2013-2025.
- Gross, J. (1991). Pigments in vegetables. Chlorophylls and carotenoids. New York: Avi Books, Van Nostrand Reinhold Company Inc, pp. 303.
- Guilbert, S. y Biquet, B. (1989). Les films et enrobage comestibles. In *L'EMBALLAGE des denre' es alimentaires de grande consommation. Technique et Documentation, Lavoisier* Apri. 320.
- Guilbert, S. y Gontard, N. (1995). Edible and biodegradable food packaging. In: Ackermann P, Jagerstad M, Ohlsson T, editors. *Foods and packaging materials—chemical interactions*. Cambridge, U.K.: The Royal Society of Chemistry. p 159–168.
- Guilbert, S., Cuq, B. y Gontard, N. (1997). Recent innovation in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 14, 741-751.
- Gupta, K.C. y Ravi Kumar, M.N.V. (2000) An Overview on Chitin and Chitosan Applications with an Emphasis on Controlled Drug Release Formulations. *Sci.: Rev. Macromol. Chem. Phys. C* 40, 273-308.
- Guttormsen, G., Singh BR y Jeng, A.S. (1995). Cadmium concentration in vegetable crops grown in a sandy soil as affected by Cd levels in fertilizer and soil-pH. *Fertilizer Res* 41:27–32.
- Hafdani, F.N., Sadeghinia, N. A. (2011). Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 5, 216-220.
- Hager, T.J. y Howard, L.R. (2006). Processing effects on carrot phytonutrients. *Hortic Sci* 41, 74–79.
- Haiping Q., Hu W., Jiang A., Tian M. y Li Y. (2011). Extending shelf-life of Fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovat. Food Sci, Emerg. Technol.* 12, 62.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1984). Oxigen toxicity oxigen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.

## Bibliografía

---

- Hamelton, A-M. (2015). Polycarbonate (PC). Plastics Europe. Association of Plastics Manufacturers. <http://www.plasticseurope.org/>
- Han C, Lederer C, McDaniel M y Zhao Y. (2004a). Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *J Food Sci* 70, S172–178.
- Han C, Zhao Y, Leonard SW y Traber MG. (2004b). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biol Technol* 33, 67–78.
- Harborne, J. B. (1986) In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*; Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Eds.; Alan R. Liss: New York, 15-24.
- Harding, S. E. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 68, 207-262.
- Hashimoto, T. y Nagayama, T. (2004). Chemical composition of ready-to eat fresh carrot. *J Food Hyg Soc Japan* 39, 324–328.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 32, 1141-1148.
- He, Ch., Pan, Y., Ji, X. y Wang, H. (2012). Antioxidants: Introduction. *Antioxidant Polymers. Synthesis, Properties and Applications*. Ed. by Cirillo, G. y Iemma, F.
- Healy, M., Green, A. y Healy, A. (2003). Bioprocessing of marine crustacean shell waste, *Acta Biotechnol.* 23, 151–160.
- Hedesiu, C.E. (2007). Structure – Property Relationships in Polyolefins. Tesis doctoral.
- Hejazi, R., Amiji, M. (2003). Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *J. Control. Release* 89, 151–165.
- Hernández, Á. S.M., Martín Gi, F.J. (2010). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. Actualizaciones en el Laboratorio Clínico, Comité de Formación Continuada. Asociación Española de Biopatología Médica.

## Bibliografía

---

- Hernández, M.L.O. (2013). El impacto de los plásticos en el ambiente. La Jornada Ecológica. <http://www.jornada.unam.mx/>
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., y Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110, 428-435.
- Hirai, I., Okuno, M., Katsuma, R., Arita, N., Tachibana, M. y Yamamoto, Y. (2010). Characterisation of Anti-Staphylococcus aureus Activity of Quercetin. *International Journal of Food Science Technology*, 45, 1250-1254.
- Hollman, P. CH y Katan, M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. & Pharmacother.* 51: 305-310.
- Hollmann, F. y Arends, I.W.C. E. (2012). Enzyme Initiated Radical Polymerizations. *Polymers*, 4, 759-793.
- Holmes, C.A. y Tabrizian, M. (2011). Enhanced MC3T3 preosteoblast viability and adhesion on polyelectrolyte multilayer films composed of glycol-modified chitosan and hyaluronic acid *J. Biomed. Mater. Res. A* 100A, 518–526.
- Hong, S.I. y Krochta, J.M. (2006). Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering* 77, 739–745.
- Hopewell, J, Dvorak, R. y Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364(1526): 2115–2126.
- Horticultura Internacional (2009). Revista de industria, distribución y socioeconomía hortícola. N°69, [www.horticom.com/](http://www.horticom.com/)
- Horton, J.A., Li, F., Chung, E.J., Hudak, K., White, A., Krausz, K. y Citrin, D. (2013) Quercetin Inhibit Sradiation- Induced Skin Fibrosis. *Radiation Research*, 180, 205-215.
- Howard, L.A., Wong, A.D., Perry, A.K. y Klein, B.P. (1999).  $\beta$ -Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables. *Journal of Food Science*, 64, 929-936.

## Bibliografía

---

- Howard, L.R. y Dewi, T. (1995). Sensory, Microbiological and Chemical Quality of Mini-Peeled Carrots as Affected by Edible Coating Treatment. *Jornal of Food Science*, 60, 142-144.
- Hromiš, M.N., Lazić, V.L., Markov, S.L., Vaštag, Z.G., Popović, S.Z., Šuput, D.Z. y Džinić, N.R. (2014). Improvement of antioxidant and antimicrobial activity of chitosan film with caraway and oregano essential oils. *BIBLID*: 1450-7188, 45, 33-43.
- Hu, G. X., Lian, Q. Q., Ge, R. S., Hardy, D. O. y Li, X. K. (2009). Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 139–145.
- Hug, V. (2012). Láminas para el envasado. *Guía Técnica*. Pentafood. Food packaging solutions.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). *Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración*. 2da Edición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. ISBN: 84-200-0908-3.
- Ikeda, I., Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y. y Hatano, K. (1993). Effects of chitosan hydrolysates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 431-435.
- Il'ina, A. V. y col. (2008). Obtaining and Study of Monosaccharide Derivatives of Low-Molecular-Weight Chitosan. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 44. 606-614.
- Infoagro (2015). Deterioro de las frutas y hortalizas frescas en el periodo de poscosecha. <http://www.infoagro.com/>
- Ismail, A. y Fun, C. S. (2003). Determination of Vitamin C,  $\beta$ -carotene and Riboflavin Contents in Five Green Vegetables Organically and Conventionally Grown. *Mal J Nutr* . 9, 31-39.
- Iwase, H. (2000). Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 881, 317–326.

## Bibliografía

---

- Jacksens, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2002). Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biol. Technol*, 26, 59-73.
- Janeiro, P., Corduneanu, O. y Oliveira Brett, A. M. (2005) Chrysin and ( $\pm$ )-Taxifolin Electrochemical Oxidation Mechanisms. *Electroanalysis*, 17:1059-1064.
- Jarvie, A.W.P., Overton, N. y St. Pourcain, C.B. (1998). Enzymatic epoxidation of polybutadiene. *Chem Commun* 177–178.
- Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Reis, R.L. y Mano, J.F. (2005). Graft copolymerized chitosan—Present status and applications. *Carbohydr. Polym.* 62, 142–158.
- Jeszka W.J. (1997). *Food Colorants. Chemical and Functional Properties of Food Components*. Technomic Publishing Company, Lancaster: 293.
- Ji, H.-F., Tang, G.-Y. y Zhang, H.-Y. (2005). Theoretical Elucidation of DPPH Radical-Scavenging Activity Difference of Antioxidant Xanthenes. *QSAR & Comb. Sci.*, 24, 826–830.
- Jo, G.H., Jung, W.J., Kuk, J.H., Oh, K.T., Kim, Y.J. y Park, R.D. (2008). Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction, *Carbohydr. Polym.* 74,504–508.
- Jo, G.H., Park, R.D. y Jung W.J. (2011). Enzymatic Production of Chitin from Crustacean Shell Waste. In: *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, S.K. Kim (Ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 37–45.
- Johansson, F. y Leufvén, A. (1995). Food packaging polymer as barrier against aroma vapour and oxygen in fat or humid environments. *Food and Packaging Materials: Chemical Interactions*, P. Ackermann, M. Tagerstand, and T. Ohesson, Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessaguan, W. y Tanaka, M. (2008). Antioxidant activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and  $\alpha$ -tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 22, 449-458.

## Bibliografía

---

- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G. y Hara, Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): Flavonoids in health and disease. Marce Dekker, Nueva York, 137-161.
- Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, K.Y. y Park, R.D. (2006). Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 234–237.
- Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, Y.J., Oh, K.T. y Park, R.D. (2007). Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3, *Carbohydr. Polym.* 68, 746–750.
- Jutaporn, C.T.; Suphitchaya, C. y Thawien, W. (2011) Antimicrobial activity and characteristics of edible films incorporated with Phayom wood (*Shorea toluca*) extract. *Int. Food Res. J.* 18, 39–54.
- Kabasakalis, V., Siopidou D. y Moshatou, E. (2000) Ascorbic acid content in commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem.* 70, 325-328.
- Kader, A. A. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 1–30.
- Kader, A.A. (1985). Postharvest biology and technology: an overview. In: *Postharvest technology of horticultural crops*. Davis, Calif.: The Regents of the Univ. of California, Division of Agriculture and Natural Resources. p 3–7.
- Kader, A.A. (1985). Quality factors: definition and evaluation for fresh horticultural crops. In: *Postharvest technology of horticultural crops*. Davis, Calif.: The Regents of the Univ. of California, Division of Agriculture and Natural Resources. p 118–121.
- Kader, A.A. (2002). Quality parameters of fresh-cut fruit and vegetable products. In: Lamikanra O, editor. *Fresh-cut fruits and vegetables*. Boca Raton, Fla.: CRC Press LLC. p 11–20.

## Bibliografía

---

- Kafkas, E., Kosar, M., Turemis, N. y Baser, K.H.C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chem.* 97, 732–736.
- Kall, M.A. y Andersen, C. (1999). Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J. Chromatogr. B.* 730,101-111.
- Kamil, Y. V. V. A., Jeon, Y. J. y Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79, 69–77.
- Kanatt S. R., Rao, M.S., Chawla, S.P. y Sharma, A. (2012). Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids* 29, 290-297.
- Kanatt, S.R., Chander, R. y Sharma A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chem.* 107, 845–852.
- Karlsen, A., Blomhoff, R. y Gundersen, T.E. (2005). High-throughput analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 824, 132-138.
- Kasaai, M.R. (2008). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 71, 497–508.
- Kester JJ. y Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technol* 40(12):47–59.
- Kim, K. W.; Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101: 308-313.
- Kimura, Y, Kashiwada, A., Matsuda, K. y Yamada, K. (2012). Use of chitosan for removal of naphthols through tyrosinase-catalyzed quinone oxidation. *Journal of Applied Polymer Science.* 125, E42–E50.
- Kiser, J.V.L. y Zannes, M. (2004). The 2004 IWSA directory of waste-to-energy plants. *Integrated Waste Services Assn.*, Washington, D.C.
- Kjartansson, G.T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K. y Weiss, J. (2006). Sonication-assisted extraction of chitin from North Atlantic shrimps (*Pandalus borealis*), *J. Agric. Food Chem.* 54, 5894–5902.

## Bibliografía

---

- Knaul, J. Z. y col. (1998) Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Can. J. of Chem.* 76, 11: 1699-1706.
- Kobayashi, S. y Makino, A. (2009). Enzymatic polymer synthesis: An opportunity for green polymer chemistry. *Chem. Rev.*, 109, 5288–5353.
- Koch, H.M. y Calafat, A.M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 364, 2063-2078.
- Krochta JM. y De Mulder-Johnston C. (1997). Edible and biodegradable polymerfilms: challenges and opportunities. *Food Technol* 51, 61–74.
- Krochta, J.M. (1997). Edible protein films and coatings. In: Damodaran S, Paraf A, editors. *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker.
- Krochta, J.M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Gennadios A, editor. *Protein-based films and coatings*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 1–41.
- Kubota, N., Tatsumoto, N., Sano, T. y Toya, K. (2000). A simple preparation of half Nacetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*, 324, 268–274.
- Kucukgulmez, A., Celik,M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H. y Kadak, A.E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126, 1144–1148.
- Kudanga, T.; Nyanhongo, G.S.; Guebitz, G.M.; Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzym. Microb. Technol.* 48, 195–208.
- Kumar, G., Smith, P.J. y Payne, G. F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 154-165.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans, *Marine Biotechnol.* 8, 203–226.
- Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T. y Nishiyama, Y. (2000). Enzymatic degradation of bchitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* 42, 19–21.



## Bibliografía

---

- La Rotta, C., Lutz, S., y col. (2005). Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation amidation and crosslinking. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 582-588.
- Lago, M.A., Rodríguez Bernaldo de Quirós, A., Sendón, R. y col. (2011). Compilation of analytical methods to characterize and determine chitosan, and main applications of the polymer in food active packaging. *CyTA – Journal of Food*, 9, 319–328.
- Lamarque, G., Lucas, J.-M., Viton, C. y Domard, A. (2005). Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: Role of various structural parameters. *Biomacromolecules*, 6, 131–142.
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A. y col. (2008) Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. *Journal of the American Medical Association*.
- Laohakunjit, N. y Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch-Starke*, 56, 348–356.
- Larson, A.J., Symons, J.D. y Jalili, T. (2012) Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Advanced Nutrition*, 3, 39-46.
- Lau, O.W. y Wong, S.K. (2000). Contamination in food from packaging materials. *J Chrom. A* 882, 255–270.
- Leadbitter, J. (2003). Packaging materials. 5. Polyvinyl chloride (PVC) for food packaging applications. Report. ILSI Europe Packaging Material Task Force.
- Lee, D. S., Yam, K. L. y Piergiovanni, L. (2008). *Food Packaging Science and Technology*, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Lee, D.W., Lim, H., Chong, H.N. y Shim, W.S. (2009). Advances in Chitosan Material and its Hybrid Derivatives: A Review. *The Open Biomaterials Journal*, 1, 10-20.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E. M. F. y Rietjens, I. M. C. M. (2001). The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology & Medicine*. 31, 869–881.
- LENNTECH (2015). Polyvinyl Chloride (PVC). <http://www.lenntech.com/>

## Bibliografía

---

- Lepiniec, L. y col. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 405–430.
- Li, H. y Yu, T. (2000). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *J Sci Food Agric* 81, 269-274.
- Li, P. y Barth, M. M. (1998). Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. *Postharvest Biology and Technology.* 14, 51–60.
- Li, P. y Barth, M.M. (1998). Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly processed carrots. *Postharvest Biol Technol* 14, 51–60.
- Li, Q.D., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. y Goosen, M.F.A. (1992). Applications and Properties of Chitosan *J Bioact Compat Polym.* 7, 370-397.
- Li, Tieqi , Ning Yan, (2007). Mechanical properties of wood flour/HDPE/ionomer composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 38, 1-12.
- Liao, F. H., Shieh, M. J., Chang, N. C. y Chien, Y.W. (2007). Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research*, 27, 146-151.
- Lima, G.P.P., daRocha, S.A., Takaki, M., Ramos, P.R.R. y Ono, E.O. (2008). Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. *Int J Food Sci Technol* 43, 1838–1843.
- Lin, D. y Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 6, 60-75.
- Lin, S. B., Lin, Y. C. y Chen, H. H. (2009). Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulose, lysozyme and chitinase: characterization and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 116, 47-53.
- Lin, S.Y.D. y Krochta, J.M. (2005). Whey protein coating efficiency on surfactant-modified hydrophobic surfaces. *J Agric Food Chem* 53, 5018–5023.

## Bibliografía

---

- Lin, Y.H., Liang, H.F., Chung, C.K., Chen, M.C. y Sung, H.W. (2005). Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials* 26, 2105–2113.
- Lithner, D., Larsson, A. y Dave, G. (2011). Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment* 409, 3309-3324.
- Liu, H., Du, Y. M., Wang, X. H. y Sun, L. P. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 147-155.
- Liu, J. N. (2008). Study on the hypolipidemic mechanism of chitosan. Doctor dissertation. Jiangnan University. Wuxi, China.
- Liu, J., Lu, J.F., Kan, J. y Jin C.H. (2013). Synthesis of chitosan-gallic acid conjugate: structure characterization and in vitro anti-diabetic potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 321–329.
- Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H. y Yu, L. J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64, 60–65.
- López-Cervantes, J. y Paseiro-Losada, P. (2003). Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Additives and Contaminants*, 20, 596–606.
- Lopez-Rubio A, Almenar E, Hernandez-Munoz P, Lagaron JM, Catala R. y Gavara R. (2004). Overview of active polymer-based packaging technologies for food application. *Food Rev Int* 20, 357–87.
- Luo, Y y Wang, Q. (2013). Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science. *J Food Processing & Beverages*, 1, 1-13.
- Luz, C. (2012). Our food packaging & public health. *Environmental Health Perspectives*. 120, A233-A237.
- Maezaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., y col. (1996). *Chitin enzymology*. Italy: Lyon and Ancona: European Chitin Society. pp. 217-232.

## Bibliografía

---

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004) Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manoj, K.M., Yi, X., Rai, G. P. y Hager, L.P. (1999). A kinetic epoxidation assay for Chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266, 301-303.
- Marsh, K y Bugusu, B. (2007a). Food Packaging and its environmental impact. *Food Technology*. 46-50.
- Marsh, K. y Bugusu, B (2007b). Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*.72, R39-R55.
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., Barat, J. M. y Barry-Ryan, C. (2009). Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 590–600.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII (6) 271-278.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M.<sup>a</sup> J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidants. *Nutr. Hosp.* XVII, 271-278.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A. y Vicente, A. A. (2012). Influence of a-tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids* 27, 220-227.
- Mate, J.I. y Krochta, J.M. (1998). Oxygen uptake model for uncoated and coated peanuts. *Journal of Food Engineering* 35, 299–312.
- Materska M. y Perucka I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53, 1750–1756.
- Materska, M. (2008). Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity – A review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58, 407-413.
- Mathew, S., y Abraham, T. E. (2008). Characterization of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.

## Bibliografía

---

- Matthews, V. (2000). Packaging materials. 1. Polyethylene terephthalate (PET) for food packaging applications. Report. ILSI Europe Packaging Material Task Force.
- Maurya S. y Singh D. (2010). Quantitative Analysis of Total Phenolic Content in *Adhatoda vasica* Nees Extracts. *International Journal of Pharmtech Research*; (4) 2403-2406.
- McHugh, T.H., Avena-Bustillos, R. y Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*. 58, 899-903.
- Md Rabiul Hussain, Iman M. y Maji, T.K. (2013). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan and Their effect on the Release Behavior of Essential Oil from Chitosan and Chitosan-Gelatin Complex Microcapsules. *International Journal of Advanced Engineering Applications*, 6, 4-12.
- Meeker, J.D., Sathyanarayana, S. y Swan, S.H. (2009) Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 364, 2097-2113.
- Mehdizadeh, T., Tajik, H., Rohani, S.M.R. y Oromiehie, A.R. (2012). Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. *Veterinary Research Forum*, 3, 167 – 173.
- Mei Y. y Zhao Y. (2003). Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films incorporated with nutraceuticals. *J. Agric. Food Chem*. 51, 1914.
- Melzer, D, Rice, N.E., Lewis, C. y col. (2010) Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 13: 5(1).
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickancaité, E. y Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med*. 26, 107-116.
- Michalski, M., Desobry, S., Mousavi, M. y Hardy, J. (1998). Prediction of mass of residues on food -contact surfaces from edible oils and their emulsions. *J Food Eng* 37:271-91.

## Bibliografía

---

- Miller KS, Upadhyaya SK. y Krochta JM. (1998). Permeability of d-limonene in whey protein films. *J Food Sci* 63,244–247.
- Miller, K.S., Krochta, J.M., 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends in Food Science and Technology* 8 (7), 228–237.
- Min S. y Krochta JM. (2005). Antimicrobial films and coatings for fresh fruit and vegetables. In: Jongen W, editor. *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*. New York: CRC Press. p 455–92.
- Momic, T, Savic, J. y Vasic, V. (2009). Oxidation of quercetin by myeloperoxidase. Hindawi Publishing Corporation. *Research Letters in Physical Chemistry*, Article ID 614362, 4 pages.
- Moon, Y.J., Wang, X. y Morris, M.E. (2006) Dietary Flavonoids: Effects on Xenobiotic and Carcinogen Metabolism. *Toxicology in Vitro*, 20, 187-210.
- Morris, D.R. y Hager, L.P. (1966). Chloroperoxidase. *J. Biol. Chem.* 241, 1763-1768.
- Mourya, V.K., Inamdar, N.N., (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *React. Funct. Polym.* 68 1013–1051.
- Mudgal, S., Lyons, L., Bain, J. y col. (2011) *Plastic Waste in the Environment – Revised Final Report for European Commission DG Environment*. Bio Intelligence Service. <http://www.ec.europa.eu/>
- Mueller, G. (1981). *Microbiología de los alimentos vegetales*. Zaragoza (Espasimna): Acribia, 291p.
- Mujica-Paz, H. y Gontard, N. (1997). Oxygen and carbon dioxide permeability of wheat gluten film: effect of relative humidity and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4101–4105.
- Murota, K y J. Terao (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, 12-17.
- Muzzarelli R.A.A., Boudrant,J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M. y Paoletti, M.G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food reservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers.* 87, 995-1012.

## Bibliografía

---

- Muzzarelli, R. A. A. y Muzzarelli, C. (2005). Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. *Adv Polym Sci*, 186, 151–209
- Muzzarelli, R. A. A., Ilari, P., Xia, W., Pinotti, M. y Tomasetti, M. (1994). Tyrosinase mediated quinone tanning of chitinous materials. *Carbohydrate Polymers*, 24, 295–300.
- Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. y Gooday, G.W. (1986). Chitin in Nature & Technology, first ed., Plenum Press, New York, USA, 287–294.
- Nagao, A., Seki, M. y Kobayashi, H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63, 1787-1790.
- Nam, K. S., Choi, Y. R. y Shon, Y. H. (2001). Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests. *Biotechnology Letters*, 23, 971-975.
- National Association for PET Container Resources (NAPCOR) (2012). PET Basics. <http://www.napcor.com/>
- Nguyen, S., Hisiger, S., Jolicoeur, M., Winnik, F.M. y Buschmann, M.D. (2009). Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and <sup>1</sup>H NMR after semi-preparative SEC. *Carbohydrate Polymers*, 75, 636–645.
- Nguyen, S., Winnik, F. M. y Buschmann, M.D. (2009). Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 75, 528–533.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S. y Azuma, I. (1984). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, 2, 93-99.
- Nisperos-Carriedo, M.O. y Baldwin, E.A. (1988). Effect of two types of edible films on tomato fruit ripening. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 101, 217.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. y Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- Nonaka, T., Uemura, Y., Ohse, K., Jyono, K. y Kurihara, S. (1997). Preparation of resins containing phenol derivatives from chloromethylstyrene-tetraethyleneglycol dimethylacrylate copolymer beads and antibacterial activity of resins. *J. Appl. Poly. Sci.*, 66, 1621-1630.

## Bibliografía

---

- North, E. J. y Halden, R. U. (2013). Plastics and Environmental Health: The Road Ahead. *Rev Environ Health*. 28, 1–8.
- Nováková, L., Solich, P. y Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 942-958.
- Nováková, L., Solichová, D., Pavlovicová, S. y Solich, P. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. *J. Sep. Sci.* 31, 1634-1644
- Odrizola-Serrano, I., Hernández-Jover, T y Martín-Belloso, O. (2007). Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*. 105, 1151–1158.
- Oehlmann, J. y col. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B364*, 2047–2062.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W. y col. (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 364, 2047-2062.
- Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M. y Wang, S.L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes, *Enzyme Microb. Technol.* 27, 3–10.
- Oliveira B. A. M. y Ghica M.E. (2003) Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, 15: 1745-1750.
- Olivier, B. y Jean-Yves, R. (2007). Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs & Aging*, 24, 573-580.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology* 50, 87–94.
- Oosthuysen, SA. (1998). Effect of environmental conditions at harvest on the incidence of lenticel damage in mango. *South African Mango Grower's Assn. Yearbook* 18:15–7.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. y Rigal, L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water up take of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*. 43, 5417-5425.



## Bibliografía

---

- Oshima, S.; Ojima, F.; Sakamoto, H.; Ishiguro, Y. y Terao, J. (1996). Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2306-2309.
- Ottøy, M.H., Varum, K.M., Christensen, B.E., Anthonsen, M.W. y Smidsrød, O. (1996). Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 31, 253–261.
- Ouattara, B., Simard, R., Piette, G., Bégin, A. y Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139-148.
- Pacheco, N., Larralde, P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A. y Shirai, K. (2008). Evaluation of Chitosans and *Pichia guillermondii* as Growth Inhibitors of *Penicillium digitatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43, 20-26.
- Packaging and Films Association. PAFA. (2015). Materials / Polyamide. <http://www.pafa.org.uk/>
- Park S. y Zhao Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin in chitosan-based films. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1933.
- Park, H.J. y Chinnan, M.S. (1990). Properties of edible coatings for fruits and vegetables. Paper No. 90-6510 presented at the International Winter Meeting, American Society of Agricultural Engineers, Chicago, Ill, December 18-21.
- Park, H.J., Chinnan, M.S. y Shewfelt, R.L. (1994). Edible coating effects on storage life and quality of tomatoes. *J. Food Sci.* 59, 568.
- Park, H.J., Weller, C.L., Vergano, P.J. y Testin, R.F. (1993) Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J. Food Sci.* 58, 1361–1364, 1370.
- Park, J. H., Saravanakumar, G. S., Kim, K. Y. y Kwon, C. (2010). Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 28-41.
- Park, P.J.; Je, J.Y. y Kim, S.K. (2004). Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr. Polym.* 55, 17–22.

## Bibliografía

---

- Park, S., Stan, S.D., Daeschel, M.A. y Zhao Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria × ananassa*) to control mold growth during cold storage. *J Food Sci* 70, M202–207.
- Park, S., y Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1933-1939.
- Parzanese, M. (2011). Vegetales Mínimamente Procesadas. Tecnología para la industria alimentaria. Ficha N°11. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/>
- Pasanphan, W. y Chirachanchai, S. (2008). Conjugation of gallic acid onto chitosan: an approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydr. Polym.* 72, 169–177.
- Pasanphan, W.; Buettner, G. R.; Chirachanchai, S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydr. Res.*, 345, 132–140.
- Pashevina, D.A., Tumanovska, L.V., Dosenko, V.E., Nagibin, V.S., Gurianova, V.L. y Moibenko, A.A. (2011) Antiatherogenic Effect of Quercetin Is Mediated by Proteasome Inhibition in the Aorta and Circulating Leukocytes. *Pharmacological Reports*, 63, 1009-1018.
- Paz, N., Pérez, D., Fernández, M., López, O.D., Nogueira, A., Rapado Paneque, M., Altanés Valentín, S. y García, C. M. (2013). Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Rev. Iberoam. Polim*, 14, 84-91.
- Pearson, R.B. (1982). PVC as a food packaging material. *Food Chemistry* 8, 85-96.
- Percot, A., Viton, C. y Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells, *Biomacromolecules*, 4,12–18.
- Peres, W. (1994). *Radicaís Livres em níveis biológicos*. Ed. Universidade Católica de Pelotas, Brasil, 49-81.
- Perez-Vizcaino, F., Bishop-Bailley, D., Lodi, F., Duarte, J., Cogolludo, A., Moreno, L. y Warner, T.D. (2006). The Flavonoid Quercetin Induces Apoptosis and Inhibits JNK Activation in Intimal Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 919-925.

## Bibliografía

---

- Peter, M.G. (2005) in: A. Steinbuchel, R.H. Marchessault (Eds.), *Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 419–512.
- Petersen, K., Nielsen, P. V., 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, 52-68.
- Peterson, J. y Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.*, 18, 1995–2018.
- Pickard, M.A., Kadima, T.A. y Carmichael, R.D. (1991). Chloroperoxidase, a peroxidase with potential, *J. Ind. Microbiol.* 7, 235-241.
- Pietta, P. G. y Simonetti, P. (1999). In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*; Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T., Eds.; Academic Press: San Diego, pp 283-308.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63,1035–1042.
- Plastic Waste: Ecological and Human Health Impacts, (2011). *Science for Environment Policy | In-depth Reports.* 1-41.
- PlasticsEurope (2009) *The Compelling Facts about Plastics 2009*. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2008. PlasticsEurope, European Plastics Converters, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations & European Plastics Recyclers.
- PlasticsEurope (2010). *Plastics the Facts 2010*. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2009. PlasticsEurope, European Plastics Converters, European Association of Plastics Recycling and Recovery Organisations & European Plastics Recyclers.
- Popp, J.L., Kirk, T.K. y Dordick, J.S. (1991). Incorporation of p-cresol into lignins via peroxidase-catalyzed copolymerization in nonaqueous media. *Enzyme Microb Technol* 13, 964–968.
- Porporatto, C., Bianco, I.D., Riera, C.M. y Correa, S.G. (2003) Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 266–272.
- Portes, E., Gardrate, C., Catellan, A., y Coma, V. (2009). Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. *Carbohydrate Polymers*, 76, 578-584.

## Bibliografía

---

- Pourcel, L., Routaboul, J.\_M., Cheynier, V., Lepiniec, L. y Debeaujon, I., (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12, 29–36.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, SJ, y Shahabimajd, N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*; (5)1142–1145.
- Prior R.L. (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 570–578.
- Qin, C., Du, Y., Xiao, L. y col. (2002) Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 31, 111–117.
- Raafat, D., Barga, K., Haas, A., Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, (12), 3764–3773.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smaghe, G. y Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4, 1457-1465.
- Raj, B., Jagadish, R.S., Srinivas, P. y Siddaramaiah. (2005). Crosslinking of low-density polyethylene by diisocyanates for superior barrier properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 1193–1199.
- Ramesh, H., y Tharanathan, R. N. (2003). Carbohydrates-the renewable raw materials of high biotechnological value. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 149-173.
- Rao, M.S., Muñoz, J. y Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 808–813.
- Rathje, W.L., Reilly, M.D. y Hughes, W.W. (1985). Household garbage and the role of packaging—the United States/Mexico City household refuse comparison. Tucson, Ariz.: SolidWaste Council of the Paper Industry Publishing. p 116.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Rhoades, J. y Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 80–84.

## Bibliografía

---

- Rice-Evans C.A., Miller J. y Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152–159.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. y Paganga, J. (1990). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, 20:933-956.
- Rivero, S., García, M. A. y Pinnoti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 369-375.
- Robertson GL. (2005). *Food Packaging: Principles and Practice*, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Robertson, G. L. (2006). *Food Packaging Principles and Practice*, 3rd ed. Taylor & Francis, CRC Press.
- Robertson, G.L. (2013). *Structure and Related Properties of Plastic Polymers*. Chapter 2. *Food packaging: principles and practice*, 3rd edition. CRC Press.
- Rocasalbas, G., Francesko, A., Touriño, S., Fernández-Francos, X., Guebitz, G. M. y Tzanov, T. (2013) Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydrate Polymers*. 92, 989-996.
- Rock CL, Loalvo JL, Emenhiser C, Ruffin MT, Flatt SW. y Schwart, S.J. (1998).
- Rodríguez Hamamura N. y col. (2010). Preparación de partículas de quitosano Reticuladas con tripolifosfato y modificadas Con polietilenglicol. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 76 (4).
- Rodriguez-Amaya, D.B., Rodriguez, E. B. y Amaya-Farfan, J. (2006). Advances in Food Carotenoid Research: Chemical and Technological Aspects, Implications in Human Health. *Ma1 J Nutr* 12, 101-121.
- Rohn,S., Rawel,H.M. y Kroll,J.(2004).Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4725-4729.
- Rojas-Grau, M.A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20, 438-447.
- Rojas-Grau, M.A., Tapia, M.S., Rodriguez, F.J., Carmona, A.J. y Martin-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids* 21, 118–127.

## Bibliografía

---

- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Divenere, D. y Salerno M. (2002). Effect of pre- and post harvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J Food Sci* 67, 1862-1867.
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., Gaya, A. y López-Sabater, M.C. (2008). Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 107, 434-438.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I. y López-Sabater M.C. (2006) Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 830, 41-46.
- Rong, Y., Wang, Z., Wu, J. y Zhao, B. (2012). A theoretical study on cellular antioxidant activity of selected flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A* 93, 235– 239.
- Rooney, M.L. (2005). Introduction to active food packaging technologies. In: Han JH, editor. *Innovations in food packaging*. San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press. p 63–79.
- Rooney, ML. (2005). Introduction to active food packaging technologies. In: *Innovations in Food Packaging* (ed. Han, J.H.), Elsevier Ltd., London, UK; pp. 63–69.
- Rosa, O. O. (2002). Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados. Lavras. 120p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras.
- Rudrapatnam N, Kittur T y Kittur F.S. (2002). Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43, 61-87.
- Rumelin, A., Fauth, U. y Halmágyi, M. (1999). Determination of ascorbic acid in plasma and urine by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 533-536.
- Sabnis, S. y Block, L.H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems. *Int. J. Biol. Macromol.* 27, 181–186.
- Sabu, M.C. y Kuttan, R. (2002). Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethanopharmacology.* 81, 155-160.

## Bibliografía

---

- Sahin, Senol , Pasa Yayla (2005). Effects of testing parameters on the mechanical properties of polypropylene random copolymer. *Polymer Testing*, 24, 613-619.
- Salinas-Hernández, R.M., González-Aguilar, G.A., Pirovani, M.E. y Ulín-Montejo, F. (2007). Modelación del deterioro de productos vegetales frescos cortados. *Universidad y Ciencia*. [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia), 23, 183-196.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., y Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
- Sanfilippo, C. y Nicolosi, G. (2002). Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the oxidation of cyclic conjugated dienes. *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 1889-1892.
- Sangaj, N.S., Malshe, V.C., 2004. Permeability of polymers in protective organic coatings. *Progress in Organic Coatings* 50 (1), 28–39.
- Santos, A.S.F., Teixeira, B.A.N., Agnelli, J.A.M. y Manrich, S. (2005). Characterization of effluents through a typical plastic recycling process: An evaluation of cleaning performance and environmental pollution. *Resources, Conservation and Recycling*, 45, 159-171.
- Sashiwa, H. y Aiba, S. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29, 887–908.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 12, 3875–3883.
- Schreiber, S. B.; Bozell, J. J.; Hayes, D. G.; Zivanovic, S. (2013). Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material. *Food Hydrocolloids*. 33, 207–214.
- Sébastien, F., Stéphane, G., Copinet, A. y Coma, V. (2006). Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydrate Polymers*, 65, 185–193.
- Seljasen, R., Bengtsson, G.B., Hoftun, H. y Vogt, G. (2001). Sensory and chemical changes in five varieties of carrot (*Daucus carota* L.) in response to mechanical stress at harvest and post-harvest. *J Sci Food Agric* 81, 436–447.

## Bibliografía

---

- Seljasen, R., Kristensen, H.L., Lauridsen, C., Wyss, G.S., Kretzschmar, U., Birlouez-Aragonee, I. y Kahlf, J. (2013). Quality of carrots as affected by pre- and postharvest factors and processing. *J Sci Food Agric*, 93, 2611–2626.
- Shaaban, H.A. y Mahmoud, K.F. (2014). In-vitro antibacterial and antioxidant properties of starch/ chitosan edible composite film incorporated with thyme essential oil. *J Arab Soc Med Res* 9, 54–61.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. y Jeon, Y-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10, 37-51.
- Sharma, K. D., Karki, S., Thakur, N.S. y Attri, S. (2012). Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review. *J Food Sci Technol*, 49, 22–32.
- Sharma, R.M. y Singh, R.R. (2000). Harvesting, postharvest handling and physiology of fruits and vegetables. In: Verma LR, Joshi VK, editors. *Postharvest technology of fruits and vegetables Vol. 1. Handling, processing, fermentation and waste management*. Tagore Garden, New Delhi: Indus Publishing Co. p 94–147.
- Shevelkova, A.N. y Ryabov, A. D. (1996). Irreversible inactivation of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase by hydrogen peroxide. A kinetic study in chloride and bromide systems. *Biochemistry and molecular biology international*. 39, 665-670.
- Shirley, B. W. (1996). Flavonoid biosynthesis: “new” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci.* 31, 377-382.
- Siddiqui, W., Chakraborty, I., Ayala-Zavala, J.F. y Dhua, R.S. (2011). Advances in minimal processing of fruits and vegetables: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 70, 823-834.
- Silavi, R., Divsalar, A. y Saboury, A.A. (2012). A short review on the structure-function relationship of artificial catecholase/tyrosinase and nuclease activities of Cu-complexes. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30, 752–772.
- Silva, E.O., Bastos, M. S.R., Wurlitzer, N. J. Barros, Z. J. y Mangan, F. ()Minimal Processing. *Fruits and Vegetables*. Chapter 8. *Advances in Fruit Processing Technologies*. pp 217-228.



## Bibliografía

---

- Simões, A. D. N., Tudela, J.A, Allende, A., Puschmann, R. y Gil, M.I. (2009). Edible coatings containing chitosan and moderate modified atmospheres maintain quality and enhance phytochemicals of carrot sticks. *Postharvest Biology and Technology* 51, 364–370.
- Simon PW y Peterson, C.E. (1979). Genetic and environmental components of carrot culinary and nutritive value. *Acta Hort* 93, 271–278.
- Simon, P.W. y Lindsay, R.C. (1983). Effects of processing upon objective and sensory variables of carrots. *J AmSocHort Sci* 108, 928–931.
- Singh, R.P. (2014). Food Preservation. Chemical Preservation. *Encyclopedia Britannica*. <http://www.britannica.com/>
- Sini, T.K., Santhosh, S. y Mathew P.T. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation, *Carbohydr. Res.* 342, 2423–2429.
- Siong, T. y Lam, L. C. (1992). Analysis of Carotenoids in Vegetables by HPLC. *ASEAN Food Journal*. 7, 91-99.
- Siracusa, V. (2012). Food Packaging Permeability Behaviour: A Report. Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Polymer Science*. Article ID 302029. 1-11.
- Siripatrawan, U. y Harte, B.R. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 24, 770-775.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*(27), 102-108.
- Sivarooan, T., Hettiarachchy, N. S. y Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781-785.
- Smidsrød, O. y Haug, A. (1971). Estimation of the Relative Stiffness of the Molecular Chain in Polyelectrolytes from Measurements of Viscosity at Different Ionic Strengths. *Biopolymers*. 10, 1213- 1227.
- Soltoft M, Nielsen J, Lauren KH, Husted S, Halekoh U y Knuthsen P. (2010). Effects of organic and conventional growth systems on the content of

## Bibliografía

---

- flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *J Agric Food Chem* 58, 10323–10329.
- Song, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R. y Davies, G. B. H. (2009). Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2127–2139.
- Sorlier, P., Denuzière, A., Viton, C. y Domard, A. (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2, 765–772.
- Sorokulova, I., Krumnow, A., Globa, L. y Vodyanoy, V. (2009). Efficient decomposition of shrimp shell waste using *Bacillus cereus* and *Exiguobacterium acetylicum*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1123–1126.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G. y Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 84-95.
- Sothornvit R. y Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of b-lactoglobulin films. *J Agric Food Chem* 48, 6298–6302.
- Sothornvit R. y Krochta, J.M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of betalactoglobulin films. *J Food Eng* 50, 149–155.
- Sothornvit, R. y Pitak, N. (2007) Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Res. Int.* 40, 365–370.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Casariego, A., Lima, A.M.P., Teixeira, J.A. y Vicente, A.A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids* 23, 2110–2115.
- Spear, L.B., Ainley, D.G. y Ribic, C.A. (1995) Incidence of plastic in seabirds from the tropical Pacific, 1984–91 – relation with distribution of species, sex, age, season, year and body-weight. *Marine Environmental Research* 40, 123–146.
- Sperling, L. H. (2006). *Introduction to physical polymer science* (4th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Srinivasa PC, Baskaran R, Ramesh MN, Prashanth KVH y Tharanathan R.N. (2002). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *Eur Food Res Technol* 215, 504-508.

## Bibliografía

---

- St. Angelo, A.J. y Vercellotti, J. R. (1989). Inhibition of warmed-over flavor and preserving of uncured meat containing materials. US Patent 4,871,556.
- Stahl, W. y Sies, H. (1992). Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr* 122, 2161-2166.
- Subramanian, P. M. (2000). Plastics recycling and waste management in the US. *Resources, Conservation and Recycling*, 28, 253-263.
- Sundaramoorthy, M., Turner, J. y Poulos T.L. (1998). Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies, *Chem. Biol.* 5, 461-473.
- Suyatma, N. E., Tighzert, L., Copinet, A. y Coma, V. (2005). Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3950-3957.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. y Suzuki, M. (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Research*, 151, 403-408.
- Talja, R.A., Helen, H., Roos, Y.H. y Jouppila, K. (2007) Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. *Carbohydr. Polym.* 67 288–295.
- Talness, C.E., Andrade, A.J., Kuriyama, S.N. y col. (2009) Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364, 2079-2096.
- Tang, G.W., Qin, J., Dolnikowski, G.G., Russell, R.M. y Grusak, M.A. (2005). Spinach or carrots can supply significant amounts of vitamin A as assessed by feeding with intrinsically deuterated vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 821-828.
- Tapia M.S., Rojas-Graü M.A., Carmona A., Rodríguez F.J., Soliva-Fortuny y Martín-Belloso O. (2008). Use of alginate and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloid* 22, 14936.

## Bibliografía

---

- Tapia M.S., Rojas-Graü M.A., Rodríguez F.J., Ramírez J., Carmona A. y Martín-Belloso O. (2007). Alginate y gellan-based edible films for probiotic coatings on freshcut fruits. *J. Food Sci.* 72, 190.
- Taylor. R.F. (1983). Chromatography of carotenoids and retinoids. *Adv. Chromatogr.* 22, 157-213.
- Tee, E.S. (1988). Carotenoids and retinoids in human nutrition. Lim, C.L. and Chong, Y.H. (Eds.). Kuala Lumpur: Institute for Medical Research.
- Teisser, F., Birlouez-Aragon, I., Tjani, Ch. y Guillard, J. C. (1996). Validation of a micromethod for determining oxidized and reduced vitamin C in plasma by HPLC-fluorescence. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66, 166-170.
- Temple, N. J. (2000). Antioxidants and Disease: more questions than answers. *Nutr. Res.* 20, 449-459.
- Teuten, E. L. y col. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2027–2045.
- Teuten, E. L., Rowland, S. J., Galloway, T. S. y Thompson, R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7759–7764.
- Thanou, M. y Junginger, H. (2005). pharmaceutical applications of chitosan and derivatives. In: Dimitriu S, editor. *Polysaccharide: Structural Diversity and Functional Versatility*, second ed., Marcel Dekker, New York, 661–670.
- Thanou, M., Verhoef, J. C. y Junginger, H. E. (2001). Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, S91-S101.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings-past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 71-78.
- Tharanathan, R. N., Srinivasa, P. C. y Ramesh, M. N. (2002). A process for production of biodegradable films from polysaccharides. *Indian Patent*, 85/DEL/02.
- Thomas, J.A., Morris, D.R. y Hager, L.P. (1970). Chloroperoxidase. VII. Classical peroxidatic, catalatic, and halogenating forms of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 245, 3129-3134.

## Bibliografía

---

- Thompson, A.K. (2003). Preharvest factors on postharvest life. In: Fruit and vegetables. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd. p 1–8.
- Thompson, R.C., Moore, C. J., Saal, F. S. V. y Swan, S.H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 364, 2153–2166.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P. y col. (2004). Lost at Sea: Where is all the plastic? *Science* 7, 838.
- Togrul, H. y Arslan, N. (2004). Extending shelf-life of peach and pear by using CMC from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in emulsions. *Food Hydrocolloids* 18, 215–26.
- Toivonen, P. M. A. y Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1-14.
- Tongdeesontorn, W., Mauer, L.J., Wongruong, S., Sriburi, P. y Rachtanapun, P. (2011). Physical properties and antioxidant activity of cassava starch-carboxymethyl cellulose films incorporated with quercetin and TBHQ. The Third Thai-Japan Bioplastics and Biobased Materials Symposium (AIST-NIA-TBIA Joint Symposium). Bangkok, Thailand. Dec. 20-21.
- Torres, E., Marín, V., Aburto, J., Beltrán, H. I., Shirai, K., Villanueva, S. y Sandoval, G. (2012). Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 151–158.
- Torronen, R., Lehmusaho M, Hakkinen S, Hanninen O. y Mykkanen H. (1996). Serum  $\beta$ -carotene response to supplementation with raw carrots, carrot juice or purified  $\beta$ -carotene in healthy nonsmoking women. *Nutr Res*, 16, 565–575.
- Treutter, D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157.
- Uchida, Y., Izume, M., Ohtakara, A. y col.. (1989). Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G. Skjak-Bræk (Ed.), *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications* (pp. 373–382). London, UK: Elsevier Applied Science.

## Bibliografía

---

- Ukai YN, Tsutsumi T. y Marakami, K. (1976). Preservation of agricultural products. U.S. patent 3,997,674.
- Uyama, H. (2007) Artificial polymeric flavonoids: Synthesis and applications. *Macromol. Biosci.*, 7, 410–422.
- Vachoud, L., Chen, T.H., Payne, G.F., Vazquez-Duhalt, R. (2001). *Enzyme Microb. Technol.* 29, 380–385.
- Vachoud, L.; Chen, T.; Payne, G.F. y Vazquez-Duhalt, R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzym. Microb. Technol.* 29, 380–385.
- Valencia-Chamorro S.S., Palou L., Del Rio M. and Perez-Gago M.B. 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 872.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol. J.; Cronin, M.T., Mazur, M. y Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 39. 44-84.
- Valverde, M.T., Marin-Iniesta, F. y Calvo L. (2010). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in Conference Pear with High Pressure Carbon Dioxide and Effects on Pear Quality. *Journal of Food Engineering*, 98, 421–428.
- Van Acker, S. A. B. E., Van den Berg, D. J., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van der Vijgh, W. J. F. y Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol Med.* 20, 331–342.
- Van de Velde, K y Kiekens, P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state C-13 NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58, 409-416.
- Van de Velde, K.y Kiekens, P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state <sup>13</sup>C NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58(4):409- 416.
- Van den Heuvel, C.J.M. (2000). Relations between spinning, molecular structure and end-use properties of polyethylene naphthalate tyre yarns. *Polymer*, 41, 4249-4266.

## Bibliografía

---

- Van het Hof KH, de Boer BCJ, Tijburg LBM, Lucius BRHM, Zijp I, West CE, Hautvast JGAJ. y Weststrate, J.A. (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *J Nutr* 130, 1189-1196.
- Van Toan, N. (2009). Production of chitin and chitosan from partially autolyzed shrimp shell materials. *The Open Biomaterials Journal*, 1, 21–24.
- Vargas M, Albors A, Chiralt A, GonzalezMartinez C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biol Technol* 41, 164–171.
- Vargas M., Pastor C., Chiralt A., Mc Clements D.J. y Martinez C.G. 2008. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* 48, 496.
- Velásquez, C.L. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1, 15-21.
- Velišek J. (1999). *Chemie potravin (II)*. OSSIS, Tabor. [www.wikipatents.com/6056962.html](http://www.wikipatents.com/6056962.html). Isolations and formulations of nutrient-rich carotenoids. United States Patent: 6056962.
- Venkatesan J y Kim SK (2014). *Springer handbook of marine biotechnology*. Springer London, Limited, 53: 10.
- Vermeiren, L., Heirlings, L., Devlieghere, F., Debevere, J., in: Raija Ahvenainen (Ed.), *Oxygen, Ethylene and Other Scavengers, Novel Food Packaging Techniques* Woodhead Publishing Limited/CRC Press LLC, 2003.
- Vieira M.G.A., da Silva M.A., dos Santos L.O. y Beppu M.M. (2011). Natural-Based Plasticizers and Biopolymer Films: A Review. *European Polymer Journal*, in press.
- Vovk, T., Bogataj, M., Roskar, R., Kmetec, V. y Mrhar, A. (2005). Determination of main low molecular weight antioxidants in urinary bladder wall using HPLC with electrochemical detector. *Int. J. Pharm.* 291, 161.
- Wagenknecht, H.A. y Woggon, W.D. (1997). Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chemistry y Biology*, 4, 367-372.

## Bibliografía

---

- Wagner, C. (2012). *Plastics. Plastic Food Packaging*. Food Packaging Forum. <http://www.foodpackagingforum.org/>
- Waldeck, J., Daum, G., Bisping, B. y Meinhardt, F. (2006). Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7879–7885.
- Wan, A., Xu, Q., Sun, Y. y Li, H. (2013). Antioxidant Activity of High Molecular Weight Chitosan and N,O-Quaternized Chitosans. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6921–6928.
- Wang L., Tu Y.Ch., Lian T.W., Hung J.T., Yen J.H. y Wu M.J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9798–9804.
- Wang, S.L. y Chio, S.H. (1998) Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187 – Waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis, *Enzyme Microb. Technol.* 22 629–633.
- Wang, T., Turhan, M. y Gunasekaran, S. (2004). Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polym Int.* 53, 911–918.
- Watada, A.E. y Qi, L. (1999). Quality control of minimally-processed vegetables. *Proc. Int. Symp. on Quality of Fresh and Fermented Vegetables. Acta Hort.* 483, 209-219.
- Watada, A.E., Ko, N.P. y Minott, D.A. (1996). Factors affecting quality of fresh-cut horticultural products. *Postharvest Biol. and Technol.* 9, 115-125.
- Wei, X. L. y Xia, W. S. (2003). Research development of chitooligosaccharides physiological activities. *Chinese Pharmaceutical Bulletin*, 19, 614-617.
- Wickens, A.P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Res Physiol.* 128, 379–391.
- Wiley, R.C. (1994). *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*, Chapman & Hall.
- Williams Ch.A. y Grayer R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539–573.



## Bibliografia

---

- Winkel-Shirley, B.S.J. (2006) The biosynthesis of flavonoids. In *The Science of Flavonoids* (Grotewold, E., ed.), pp. 71–95, Springer.
- Wójcik, W. y Złotek, U. (2008). Use of Chitosan Film Coatings in the Storage of Carrots (*Daucus carota*). *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*. 13,141-148.
- Wu, A. C. M., Bough, W. A., Conrad, E. C., & Alden, K. E. J. (1976). Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 128, 87–99.
- Wu, L. Q., Embree, H. D., Balgley, B. M., Smith, P. J. y Payne, G. F. (2002). Utilizing renewable resources to create functional polymers: chitosan-based associative thickener. *Environmental Science and Technology*, 36, 3446–3454.
- Xia, W. S. (2003). Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 3, 77-81.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J. y Chen, J. (2010). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*. 1-10. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.003
- Xie, W., Xu, P. y Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 1699–1701.
- Xu, Y., Gallert, C. y Winter, J. (2008). Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 687–697.
- Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A. y Nag, D. (2005). Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Ind. Crop. Prod.* 21, 185–192.
- Xue, C., Yu, G. T., Hirata, J., Terao, J. y Lin, H. (1998). Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine- liposomal suspension and organic solvents. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 206–209.
- Yanagisawa, M., Kato, Y., Yoshida, Y. y Isogai, A. (2006). SEC-MALS study on aggregates of chitosan molecules in aqueous solvents: Influence of residual Nacetyl groups. *Carbohydrate Polymer*, 66, 192–198.

## Bibliografía

---

- Yang, E.-J., Kim, J.-G., Kim, J.-Y. y col. (2010) Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW264.7 cells. *Centr. Eur. J. Biol.*, 5, 95–102.
- Yang, L. y Paulson, A.T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International* 33, 571–578.
- Yen, G.C. y Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J Agric Food Chem.* 42, 629–632.
- Yi, H.M., Wu, L.Q., Bentley, W.E., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Culver, J.N., Payne, G.F. (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules* 6, 2881–2894.
- Yomota, C.; Miyazaki, T. y Okada, S. (1993). Determination of the viscometric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography. *Colloid Polym Sci* 271, 76-82
- Yoon, J.S., Chae, M.K., Lee, S.Y. y Lee, E.J. (2012) Anti-Inflammatory Effect of Quercetin in a Whole Orbital Tissue Culture of Graves' Orbitopathy. *British Journal of Ophthalmology*, 96, 1117-1121.
- Youn, S.K.; Kim, Y.J. y Ahn, D.H. (2001). Antioxidative effects of chitosan in meat sausage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30, 477–481.
- Yu, P.X., Zhou, Q.J., Zhu, W.W., Wu, Y.H., Wu, L.C., Lin, X. y Qiu, B.T. (2013) Effects of Quercetin on LPS-Induced Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) in Rabbits. *Thrombosis Research*, 131, e270-e273.
- Zaman, W.U, Akram, M. y Rehman, R. (2013). Effect of Temperature Variations during Cooking and Storage on Ascorbic Acid Contents of Vegetables: A Comparative Study. *J.Chem.Soc.Pak.* 35, 1-4.
- Zaman, W.U, Akram, M. y Rehman, R. (2013). Effect of Temperature Variations during Cooking and Storage on Ascorbic Acid Contents of Vegetables: A Comparative Study. *J.Chem.Soc.Pak.* 35, 1-4.
- Zavaleta-Avejar, L., Bosquez-Molina, E., Gimeno, M., Pérez-Orozco, J.P.y Shirai, K. (2014). Rheological and antioxidant power studies of enzymatically grafted chitosan with a hydrophobic alkyl side chain. *Food Hydrocoll.* 39, 113–119.

## Bibliografía

---

- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. y Eskin, N. A. M. (1991). Polyphenol oxidases. In D. S. Robinson, & N. A. M. Eskin (Eds.), *Oxidative enzymes in foods* (pp. 217-273). London: Elsevier.
- Zhang, D. y Quantick, P.C. 1998. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *J Hort Sci Biotechnol* 73:763–767.
- Zhao, S.S. y Luong, J.H.T. (1996). An electrocatalytic approach for the measurement of chlorophenols, *Anal. Chim. Acta* 327, 235-242.
- Zhao, X. R. y Xia, W. S. (2006). Antimicrobial activities of chitosan and application in food preservation. *Chinese Food Research and Development*, 27, 157-160.
- Zhao, Y. y McDaniel, M. 2005. Sensory quality of foods associated with edible film and coating systems and shelf-life extension. In: Han JH, editor. *Innovations in food packaging*. San Diego, Calif.: Elsevier Academic Press. p 434–453.
- Zheng, L. Y. y Zhu, J. F. (2003). Study on microbial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 527–530.
- Zheng, L. Y., y Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 527-530.
- Zhou, K., Xia, W., Zhang, C. y Yu, L. (2006). In vitro binding of bile acids and triglycerides by selected chitosan preparations and their physicochemical properties. *LWT- Food Science and Technology*, 39, 1087-1092.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V. y Maté, J.I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT – Food Science and Technology* 41, 2159–2165.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V. y Maté, J.I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology* 41, 2159-2165.
- Zivanovic, S., Davis, R.H. y Golden, D.A. (2015) Chitosan as an antimicrobial in food products. Cap.8. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Volume 361, 153-181.
- Zivanovic, S., Davis, R.H. y Golden, D.A. (2015). Chitosan as an antimicrobial in food products. University of Tennessee, Knoxville, TN, USA.