

Índice

Autores

Marina Patricia Arrieta

MSc. en Tecnología de los Alimentos
Jefe de Trabajos Prácticos y Miembro Investigador
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Católica de Córdoba, Argentina

Mercedes Ana Peltzer

Dra. en Química
Investigadora Contratada Doctora
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Ciencias
Universidad de Alicante, España

Maria Del Carmen Garrigos Selva

Dra. en Química
Profesora Ayudante Doctora
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Ciencias
Universidad de Alicante, España

Alfonso Jimenez Migallon

Dr. en Ciencias Químicas
Profesor Titular de Universidad
Director del grupo de investigación "Análisis de Polímeros y Nanomateriales"
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Ciencias
Universidad de Alicante, España

Resumen	5
1. Introducción	5
2. Objeto y Alcance	6
3. Materiales y Metodología	6
3.1. Materiales	6
3.2. Preparación de las muestras	6
3.3. Caracterización térmica	7
3.3.1. Análisis termogravimétrico (TGA)	7
3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	7
3.4. Caracterización estructural y superficial	7
3.4.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	7
3.4.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	8
3.5. Caracterización colorimétrica	8
3.6. Propiedades mecánicas	8
3.7. Propiedades de barrera al oxígeno	9
3.8. Estudio de la actividad antimicrobiana de las biopelículas	9
3.9. Estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento	9
3.10. Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas	10
3.11. Plan de trabajo	10
3.11.1. Cronograma	11
4. Resultados	12
4.1. Caracterización de los materiales de partida	12
4.1.1. Caracterización térmica	12
4.1.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	13
5. Obtención de las biopelículas	15
5.1. Optimización del método de obtención de las biopelículas	15
5.2. Preparación de las biopelículas	15
6. Caracterización completa de las biopelículas obtenidas	15
6.1. Caracterización estructural de las biopelículas	15
6.1.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de las biopelículas	15
6.1.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de las biopelículas	17

6.2.	Caracterización térmica de las biopelículas	18
6.2.1.	Análisis termogravimétrico (TGA) de las biopelículas	18
6.2.2.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las biopelículas	19
6.3.	Caracterización óptica de las biopelículas	20
6.4.	Caracterización mecánica de las biopelículas	21
6.5.	Propiedades de barrera al oxígeno	21
6.6.	Estudio de la actividad antibacteriana de las biopelículas	22
6.7.	Estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento	22
6.7.1.	Estudio de la actividad antibacteriana de las biopelículas durante el almacenamiento	23
6.7.2.	Caracterización mecánica de las biopelículas durante el almacenamiento	23
6.8.	Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas	24
7.	Discusión	24
8.	Conclusiones	26
9.	Bibliografía	26

RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado un sistema de envasado activo basado en biopelículas de caseinato de sodio y de calcio con adición de un plastificante y un agente activo. Para ello, se utilizó glicerol como plastificante en distintas proporciones: 0%, 15%, 25% y 35% en peso con respecto a la proteína empleada como polímero base. Como agente activo se utilizó carvacrol debido a sus propiedades antimicrobianas en una concentración inicial de 10% en peso en relación a la cantidad de proteína. Una vez obtenidas las biopelículas, se estudiaron sus propiedades estructurales, térmicas, mecánicas, ópticas, de barrera al oxígeno, antimicrobianas así como su biodegradación.

Se obtuvieron películas translúcidas con microestructura homogénea, con buena dispersión de los aditivos en la matriz polimérica. El aumento en la proporción de plastificante o de carvacrol mejoró la flexibilidad de las biopelículas reduciendo su fragilidad. Las biopelículas conteniendo carvacrol presentaron propiedades antimicrobianas incluso tras 21 días de almacenamiento a 25 °C y 50 % de humedad relativa, mostrando excelentes propiedades de barrera al oxígeno así como una rápida degradación física en condiciones de compostaje, lo que contribuye a reducir de forma significativa el impacto medioambiental.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que la mejor formulación correspondió a las biopelículas de caseinato de sodio con 35% de glicerol y 10% de carvacrol (NaCas-G35%-CV10%) ya que permitieron obtener la mejor relación entre sus propiedades y la sostenibilidad medioambiental inherente a este tipo de materiales.

PALABRAS CLAVES: caseinato de sodio, caseinato de calcio, glicerol, carvacrol, biopelículas, biodegradación.

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés en el desarrollo de productos alimenticios de alta calidad, con mayor vida útil y con un impacto ambiental reducido ha fomentado el estudio y desarrollo de films y revestimientos basados en biopolímeros [1], que son producidos principalmente a partir de recursos renovables, como la caña de azúcar, proteínas y almidones. Estos materiales son utilizados para distintas aplicaciones y se caracterizan por un consumo total de energía menor que sus homólogos petroquímicos y un menor efecto sobre el medio ambiente [2].

Los productos lácteos contienen muchos compuestos diferentes con propiedades funcionales adecuadas y algunos de ellos, como la caseína, se han utilizado ampliamente en diversas aplicaciones. Así, por ejemplo, la caseína actualmente se utiliza como adhesivo, para revestimientos, encolados, fibra textil, acabado del cuero, industria papelera o en el envasado como biopelículas [3]; entre otras aplicaciones.

La transparencia, biodegradabilidad y buenas propiedades de barrera al oxígeno y al dióxido de carbono hacen de las películas de caseína materiales innovadores para su uso en el envasado de alimentos. Sin embargo, los materiales basados en caseína poseen dos desventajas en comparación con otras películas en base proteica: propiedades dúctiles limitadas y alta sensibilidad al vapor de agua [2,3]. Para solucionar estos inconvenientes es necesario utilizar plastificantes para mejorar su flexibilidad. Los plastificantes reducen la catidad de enlaces de hidrógeno entre las distintas cadenas moleculares, aumentando así los espacios intermoleculares y causando un incremento en las propiedades dúctiles del material por un descenso de su rigidez, aunque también pueden disminuir sus propiedades de barrera debido a un incremento en el volumen libre. Los plastificantes más habituales para este tipo de materiales son los polioles, azúcares o almidones, debido a su compatibilidad con las proteínas y su capacidad para favorecer la elasticidad y flexibilidad de las biopelículas obtenidas [3].

Los envases antimicrobianos son considerados uno de los sistemas de envasado activo más prometedores, al inhibir la acción de los microorganismos causantes de la contaminación de los alimentos [4]. Las bacterias son, sin duda, el grupo más importante de microorganismos asociados con los alimentos, tanto por lo que se refiere a la potencial transmisión de enfermedades como a las alteraciones que son capaces de provocar en los propios alimentos [5]. Los envases activos antimicrobianos son sistemas capaces de controlar la descomposición microbiológica de productos perecederos [6].

Los aceites esenciales extraídos de plantas se utilizan principalmente como fragancias o para dar sabores, pero en la actualidad han cobrado un nuevo interés centrado al ser ricos en compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas [7]. En concreto, se deben citar los aceites esenciales de orégano (carvacrol y timol); clavo (eugenol) canela (cinamaldehído y eugenol) y romero (ácido carnósico y carnosol). Varios de estos compuestos como el carvacrol y el timol han demostrado poseer también un efecto sinérgico en sus propiedades, potenciando su capacidad como antioxidantes [8]. Algunos investigadores han adicionado con éxito aceites esenciales de orégano a distintas matrices poliméricas: películas preparadas a base de quitosano, carboximetil-celulosa y caseína, enriquecidas con oleorresinas conteniendo orégano y carvacrol [9]; carvacrol en polietileno de alta densidad [10], en biopolímeros basados en proteína del suero lácteo [4] y en envases basados en proteína de soja [11]; timol a policaprolactona [12] entre otros. En el presente trabajo se eligió utilizar el carvacrol como agente bioactivo debido a sus conocidas propiedades antimicrobianas frente a un amplio espectro de microorganismos [13]. Los aceites esenciales y sus componentes, como el carvacrol, están clasificados como aromatizantes según la Decisión de la Comisión Europea 2002/113/CE y, además son reconocidos como seguros al ser clasificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) [10].

El diseño de un sistema de envasado activo permite reducir la cantidad de aditivos alimentarios, y de esta forma poder comercializar alimentos libres de aditivos sintéticos. Las biopelículas comestibles derivadas de los caseinatos pueden reemplazar potencialmente a algunos polímeros sintéticos utilizados en el envasado de alimentos, debido a la similitud en sus propiedades con el añadido de su naturaleza renovable y biodegradable [14]. Además, los costes de producción de este tipo de biopolímeros se encuentran en condiciones de entrar en competencia comercial con los polímeros de uso común, como las poliolefinas o el PVC.

En resumen, estos nuevos materiales constituyen sistemas de envasado innovadores con un elevado potencial comercial capaces de permitir la incorporación de aditivos activos con características antimicrobianas y que a su vez representan una importante reducción en el impacto medioambiental causado por los residuos procedentes de los envases alimentarios. Esta es la razón de su estudio en el presente proyecto.

2. OBJETO Y ALCANCE

El objetivo principal del presente proyecto es el desarrollo de un material activo antimicrobiano biodegradable y sostenible con el medio ambiente para el envasado de alimentos. En concreto, se obtendrán biopelículas en base proteína láctea (caseinatos), adicionando un plastificante (glicerol) y un compuesto con características antimicrobianas (carvacrol), ambos de origen natural. Para ello, será necesaria la formulación y caracterización completa de los materiales obtenidos, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana.

Este objetivo general, se pueden desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de los materiales de partida (glicerol, carvacrol, caseinato de sodio y caseinato de calcio).
- Obtención de biopelículas de caseinatos modificadas con estos aditivos.
- Caracterización completa de las biopelículas obtenidas.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana de las biopelículas.
- Estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento.
- Estudio de la biodegradabilidad.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Materiales

Los materiales utilizados para la elaboración de las biopelículas desarrolladas en el presente trabajo se indican a continuación:

- Caseinato de sodio (Lote STD: 11868 - Ferrer Alimentación S.A.)
- Caseinato de calcio (Lote A: 11866 - Ferrer Alimentación S.A.)

- Glicerol anhidro pureza 99,5% (Fluka, Madrid, España)
- Carvacrol pureza 98% (Sigma Aldrich, Móstoles, España)
- Agua destilada

En la Tabla I se especifican los microorganismos que se han empleado para los ensayos bacteriológicos mientras que en la Tabla II se muestran los reactivos utilizados para el diagnóstico bacteriológico.

Tabla I. Bacterias indicadoras utilizadas (Colección Española de cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia).

Bacteria	Número ATCC
<i>E. coli</i>	25922
<i>S. aureus</i>	25923

Tabla II. Reactivos para el diagnóstico bacteriológico (Insulab).

Reactivo	Composición (g/L)	Presentación
Tampón Peptona Agua	Peptona de caseína (10,0); Cloruro Sódico (5,0); Fosfato disódico (12); Agua (9,0); Fosfato Potásico (1,5)	Tubo 10 mL
Caldo Triptona Soja	Peptona de caseína (17,0); Peptona de Soja (3,0); Cloruro Sódico (5,0); Fosfato Potásico (2,5); D (+) Glucosa.	Tubo 9 mL
Agar Nutriente	Extracto de carne (1,0); Extracto de levadura (2,0); Peptona (5,0); Cloruro de Sodio (5,0); Agar (15,0)	Placa de Petri
Agar Mueller Hinton	Hidrolizado de caseína (17,5); Infusión de carne (2,0); Almidón (1,5); Agar (17,0)	Placa de Petri

3.2. Preparación de las muestras

Las películas fueron preparadas disolviendo 5 g (con precisión de 0,0001g) de proteína láctea (caseinato de sodio o caseinato de calcio) en agua destilada y calentando hasta 65 °C para facilitar su solubilización. Posteriormente, se homogeneizó la mezcla bajo agitación continua durante 10 minutos a 1100 rpm con un agitador magnético (SBS Magnetic Stirrer).

Tras la disolución total del polímero se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se añadió la cantidad requerida de glicerol anhidro para obtener las siguientes relaciones proteína:plastificante, 1:0; 1:0,15; 1:0,25; 1:0,35. Una vez incorporado el plastificante, se homogeneizaron las soluciones durante 3 minutos con agitación a 1100 rpm y por último se sometieron a un tratamiento en baño de ultrasonidos durante 10 minutos para eliminar las burbujas de aire que pudieran haber quedado en disolución.

Se prepararon biopelículas con y sin agente antimicrobiano. En el primer caso, se agregó la cantidad de carvacrol necesaria para obtener una relación proteína:antimicrobiano: 1:0,10; con posterior agitación continua durante 3 minutos a 1000 rpm.

Una vez preparadas las soluciones formadoras de biopelículas, se colocaron 30 mL de cada disolución en cápsulas de Petri de polietileno (15 cm de diámetro) y posteriormente se secaron a 25 °C y 50 % de humedad relativa durante 48 horas.

3.3. Caracterización térmica

La caracterización térmica y algunos aspectos de la caracterización estructural de los materiales plásticos se suele llevar a cabo con el uso de las técnicas de análisis térmico, las cuales permiten evaluar ciertas propiedades físicas y químicas de una muestra cuando es sometida a un programa de temperaturas. Mediante el empleo de dichas técnicas se pueden identificar numerosos procesos relacionados con alguna característica del material [15]. Así, el estudio del comportamiento de las biopelículas a altas y bajas temperaturas, la determinación de parámetros clave para describir los cambios estructurales en los materiales durante el procesado y la adición de los diferentes componentes de las formulaciones se llevó a cabo mediante las técnicas de análisis térmico que se describen brevemente a continuación.

3.3.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría es una técnica analítica que determina la pérdida de peso de una muestra en función de la temperatura o el tiempo, lo que permite asociar dichos cambios a determinados procesos de degradación. La medición se lleva a cabo en atmósferas perfectamente definidas, habitualmente nitrógeno (condiciones inertes) o bien en aire u oxígeno (condiciones oxidativas). La masa de la muestra sometida a un programa de temperaturas queda registrada por una balanza de alta sensibilidad en cada instante [15]. Ésta es una de las principales técnicas que se utilizan en el análisis de polímeros, sobre todo para estudiar el comportamiento a altas temperaturas, y se han descrito un amplio número de aplicaciones en numerosos materiales: comparación de estabildades térmicas relativas, efecto de los aditivos en la resistencia térmica del polímero, estudios sobre cinéticas de degradación, etc.

Con el fin de conocer su comportamiento a altas temperaturas y su resistencia a la degradación térmica se estudió mediante TGA la estabilidad térmica de todos los materiales de partida y de las biopelículas desarrolladas. Para ello, se realizaron los ensayos en modo dinámico utilizando una termobalanza TGA/SDTA 851e Mettler Toledo (Schwarzenbach, Suiza) con un programa de temperaturas entre 30-700 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹ en atmósfera inerte de nitrógeno (caudal de 50 mL min⁻¹). Para el caso de las biopelículas, se incluyó una etapa adicional a partir de 700 °C y hasta 900 °C en atmósfera

oxidante de oxígeno (caudal de 50 mL min⁻¹), con el fin de determinar el residuo inorgánico en cada una de las formulaciones.

3.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Esta técnica se basa en el registro de la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la muestra y un material inerte de referencia sometidos ambos al mismo programa de temperaturas. La diferencia de energía registrada por el instrumento es equivalente a la energía térmica absorbida o disipada en el curso de una transición por parte del material. En ese momento se registran los desplazamientos desde la línea base en el termograma para dicha transición, cuya área es proporcional a la variación entálpica asociada [16]. Los cambios en la temperatura de la muestra son debidos a transiciones entálpicas, endotérmicas o exotérmicas, y se relacionan con cambios estructurales o de fase en el material. Entre los procesos físicos con transiciones de fase endotérmicas se incluyen la fusión, vaporización, sublimación y desorción. La absorción y adsorción suelen ser procesos endotérmicos, mientras que las transiciones cristalinas pueden ser tanto exotérmicas como endotérmicas, aunque lo más habitual en polímeros es que los procesos de cristalización impliquen un cambio energético de carácter exotérmico.

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando un calorímetro DSC Q-2000 V23.12 Build 103 de TA Instruments (New Castle, DE, USA). Todos los ensayos fueron realizados entre -90 °C y 150 °C, a una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹ durante la primera etapa del calentamiento con posterior enfriamiento hasta -90 °C y una segunda etapa de calentamiento hasta 180 °C, siempre a la misma velocidad. Los ensayos se realizaron en atmósfera inerte de nitrógeno (50 mL min⁻¹).

3.4. Caracterización estructural y superficial

Los ensayos de caracterización estructural se utilizan para conocer en detalle las modificaciones en la estructura química de los materiales empleados, así como los cambios producidos tras la adición de diferentes componentes o bien tras las diversas etapas por las que transcurre durante su procesado o vida útil. Además, permiten comprobar la ausencia de separación de fases y consiguiente homogeneidad de los materiales. En el presente trabajo se estudió la homogeneidad de los materiales obtenidos empleando las técnicas de caracterización estructural que se describen a continuación.

3.4.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia de infrarrojo (IR) es una técnica muy empleada para la caracterización estructural de polímeros y está basada en las vibraciones de los átomos y grupos funcionales en las moléculas a causa de su interacción con la radiación emitida en la región infrarroja del espectro electromagnético. El espectro infrarrojo se obtiene ha-

ciendo pasar a través de la muestra una radiación de la longitud de onda adecuada y determinando qué fracción de la energía incidente es absorbida a causa de los diferentes movimientos moleculares. La energía a la que aparece un pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de vibración de uno o varios grupos funcionales de la molécula [17] e implica la absorción de una cierta cantidad de energía de la radiación incidente.

En el presente trabajo, se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar los grupos funcionales y poder observar los posibles cambios causados por las interacciones entre los distintos componentes de la mezcla. El instrumento utilizado fue un espectrofotómetro infrarrojo Bruker Analytik IFS 66 (Ettlingen, Alemania), que dispone de una fuente de IR medio con un rango de trabajo entre 9000-100 cm⁻¹, un divisor de haz de KBr y un detector DTGS. Las medidas se llevaron a cabo en modo reflectancia total atenuada (ATR) utilizando un accesorio Golden Gate con cristal de diamante, que permite el análisis directo de la muestra sin necesidad de preparación previa. Los espectros se registraron en el intervalo de números de onda comprendido entre 600 y 4000 cm⁻¹, utilizando una muestra con un tamaño aproximado de 5 mm². Para el registro de fondo y el de las muestras se utilizaron 64 barridos y una resolución de 4 cm⁻¹, obteniéndose los espectros de absorbancia en función del número de onda (cm⁻¹).

3.4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para estudiar la morfología de la superficie y las secciones al corte transversal de las biopelículas obtenidas se empleó la microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica permite el análisis microscópico de los polímeros con muy alta resolución y se basa principalmente en un bombardeo de electrones de alta energía que forman un haz de pocos nanómetros de diámetro que barre la superficie del material formando una imagen con los electrones secundarios que se generan en la interacción de la radiación electrónica con una capa superficial y fina de la muestra. Mediante un detector apropiado se registra el resultado de esta interacción para dar imágenes topográficas en dos dimensiones. Incluso, en ciertos casos, permite registrar imágenes en tres dimensiones [17].

Para poder observar la imagen de una muestra en un microscopio electrónico de barrido ésta debe ser conductora. Como los polímeros no son buenos conductores, las muestras fueron cortadas en piezas de 1 cm² y recubiertas de una fina capa de oro con un espesor comprendido entre 10 y 25 nm. Para ello, se utilizó un metalizador / evaporador BALZERS modelo SCD 004 (Balzers, Liechtenstein) de bajo vacío.

Una vez preparadas las muestras se realizaron microfotografías de las mismas a magnificaciones de 500x y 1000x. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-840 (Tokio, Japón), que consta de un detector de electrones secundarios tipo centelleador-fotomultiplicador con resolución 4 nm, un detector de electrones retrodispersados tipo Si P-N con resolución 10 nm y

un detector de rayos X tipo UHV Dewar Si(Li) de Bruker para microanálisis (EDS), capaz de detectar elementos de número atómico comprendido entre los del carbono y el uranio. Se utilizó una aceleración electrónica de 10kV.

3.5. Caracterización colorimétrica

La determinación del color de un material mediante el uso de técnicas espectrofotométricas permite conocer las variaciones en su coloración según la formulación, lo cual es un parámetro muy importante en materiales que vayan a ser utilizados en envasado de alimentos.

El instrumento utilizado en el presente trabajo fue un espectrofotómetro KONICA CM-3600d COLORFLEX-DIFF2, HunterLab, Hunter Associates Laboratory, Inc, (Reston, Virginia, USA); el cual permite la medida del color por reflexión y por transmisión. Los valores obtenidos por el equipo se dan en las coordenadas del espacio colorimétrico CIELAB formado por un sistema cartesiano definido por tres coordenadas que describen el color de un objeto. Así, L* indica la luminosidad, es decir la cantidad de luz percibida que refleja o transmite un material y puede tomar valores entre 0 y 100; a* indica la saturación o desviación del punto acromático de L* hacia el rojo o hacia el verde (si a* > 0 hacia el rojo y si a* < 0 hacia el verde); y b* es el ángulo de tono que define la desviación de L* en el eje amarillo y/o azul (si b* > 0 hacia el amarillo y si b* < 0 hacia el azul).

3.6. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de un material se refieren a su respuesta cuando se ve sometido a una fuerza externa, la cual se puede relacionar con la deformación que llega a sufrir [18]. De los diferentes ensayos existentes para esta determinación, el más empleado es el ensayo de tracción en una dimensión, el cual permite evaluar las propiedades más relevantes del material cuando se pretende estudiar los cambios en su ductilidad, permitiendo evaluar de forma precisa su capacidad para soportar esfuerzos y deformaciones sin que se vea alterado. La información que suministra el ensayo de tracción es muy completa ya que permite cuantificar la respuesta elástica y plástica del material a través de sus propiedades resistentes, como el módulo elástico de Young (E) y las dúctiles: porcentaje de deformación a la rotura (ε_b%), permitiendo obtener la curva tensión (σ) – deformación (ε) (Figura 1) donde se registra el esfuerzo aplicado en función de la deformación del material, que aumenta a velocidad constante.

A partir de las gráficas tensión-deformación como la mostrada en la Figura 1 se pueden determinar los siguientes parámetros:

- En la parte inicial de la curva se cumple la relación lineal: $E = \sigma/\epsilon$, donde E es el módulo de elasticidad de Young, que es la pendiente de esta parte de la curva; y E₀ el modulo inicial de la curva, siendo $E_0 = (d\sigma/d\epsilon)$ para $\epsilon = 0$.

- Resistencia máxima a la tracción (σ_m) como el máximo de la curva para cada material.
- Deformación en la rotura del material y tensión en el punto de rotura (ε_r, σ_r)

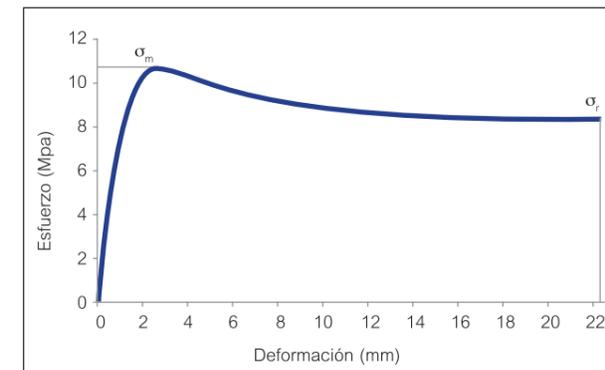


Figura 1. Representación cualitativa de un diagrama tensión vs deformación de un polímero.

Las propiedades mecánicas a tracción de las distintas biopelículas obtenidas se estudiaron de acuerdo a la norma ASTM D882-91-01 [19]. Para ello se utilizó una máquina de ensayos universales Single Column System Instron Instrument Modelo 3344 (Fareham Hants, UK) equipada con una célula de carga de 2 kN. Las probetas utilizadas se cortaron en forma rectangular con dimensiones 10 x 100 mm, y se colocaron en la máquina con una distancia entre mordazas de 50 mm, siendo sometidas a una velocidad de elongación de 25 mm min⁻¹. Para cada formulación se realizaron 5 repeticiones del ensayo. La ductilidad de las muestras se analizó mediante la determinación del módulo de Young (MPa) y del porcentaje de deformación (ε%).

3.7. Propiedades de barrera al oxígeno

Una de las propiedades más importantes cuando se trata de diseñar un sistema para envasado de alimentos es la permeabilidad a los gases, en particular al oxígeno. Este gas es capaz de participar en reacciones químicas perjudiciales para los alimentos y por eso su presencia debe estar limitada por el material de envase en la mayor parte de los casos.

Para la determinación de la velocidad de transferencia de cualquier gas a través de una película de un material polimérico se debe tener en cuenta la segunda ley de Fick (Ecuación 1).

$$Q = D A t (c_1 - c_2) / e$$

Ecuación 1. Segunda ley de Fick.

Esta ecuación relaciona la cantidad de gas que atraviesa el material (Q) con el área de la película (A), el tiempo de contacto (t), la diferencia de concentración de permeante entre las dos caras de la película (C₁-C₂) y su espesor (e). El coeficiente de difusión (D) se considera como una constante de proporcionalidad y es una medida

de la velocidad con que las moléculas atraviesan el film polimérico.

En el presente trabajo se utilizó un analizador de permeación de oxígeno de Systech Instruments modelo 8500 (Metrotec S.A, España). Se determinó la velocidad de transmisión de oxígeno (OTR) a través de las biopelículas hasta alcanzar el estado estacionario en cada caso. Las muestras preparadas como biopelículas circulares de 14 cm de diámetro, las cuales se colocaron en la cámara de difusión separando sus dos compartimentos. En el superior se introdujo oxígeno puro y en el inferior se circuló una corriente de nitrógeno. En este último se cuenta con un sensor de oxígeno, de forma que se puede registrar un valor de velocidad de transmisión por unidad de superficie y de tiempo. Para poder comparar los resultados de las muestras entre sí, se midió el espesor promedio de cada una de las biopelículas y se multiplicó por el valor registrado por el equipo. Las determinaciones se realizaron por duplicado en todos los casos.

3.8. Estudio de la actividad antimicrobiana de las biopelículas

A partir de la caracterización llevada a cabo se seleccionaron las formulaciones óptimas, de las cuales se determinó su actividad antimicrobiana mediante la realización de ensayos microbiológicos simples y rápidos. Existen una serie de microorganismos llamados marcadores cuya presencia en los alimentos advierte sobre una inadecuada manipulación de la materia prima o eventual contaminación, con la consiguiente existencia de un peligro para la salud del consumidor [20].

En el presente trabajo, la actividad antimicrobiana de las biopelículas seleccionadas se evaluó mediante el método de difusión de disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) [21]. De esta manera se llevaron a cabo ensayos por contacto directo entre la biopelícula y el medio de cultivo inoculado, con una concentración inicial de microorganismo de 10⁶ UFC mL⁻¹, a una temperatura de 37 °C durante 24 horas y en condiciones de esterilidad.

Para el presente estudio se seleccionaron dos bacterias indicadoras susceptibles de estar presentes en los alimentos: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *E. coli* sugiere contaminación de origen fecal, mientras que *S. aureus* se relaciona con la piel, las mucosas y el tracto respiratorio de los animales y el hombre [20], siendo un microorganismo muy útil como indicador de una inadecuada manipulación.

3.9. Estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento

Las proteínas constituyentes de las biopelículas pueden verse afectadas en gran medida por las condiciones de almacenamiento. Por ello, se realizó un estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento de las biopelículas

con el fin de definir y delimitar sus condiciones de aplicabilidad para envasado alimentario y conocer si mantienen sus propiedades con el tiempo.

Se seleccionaron las biopelículas que presentaron mejores características y se almacenaron en una cámara climática a 25 °C y 50 % de humedad relativa. Posteriormente se fueron retirando de la cámara climática para su análisis a diferentes tiempos: 7, 14, y 21 días, llevándose a cabo los mismos ensayos antimicrobianos comentados en el apartado anterior para comprobar si las biopelículas conservan o pierden su capacidad antimicrobiana en el tiempo mencionado. Asimismo, y para evaluar un posible cambio en la respuesta elástica y plástica del material, se estudiaron también sus propiedades mecánicas a tracción comentadas en el apartado 3.6.

3.10. Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores se evaluó la mejor formulación, teniendo en cuenta las biopelículas que mostraron un mejor compromiso entre las propiedades mecánicas y su acción antimicrobiana. Así, se estudió su biodegradabilidad, de forma que se pueda constatar su contribución a un menor impacto medioambiental.

Los estudios para comprobar el grado de desintegración física de las películas desarrolladas se llevaron a cabo en reactores de compostaje dentro de los cuales se introdujo 1 kg de compost, que consiste en un fertilizante compuesto por un 80% de turba negra y un 20% de estiércol compostado con las características indicadas en la Tabla III. Los reactores consistieron en cajas de 18 cm x 18 cm x 10 cm (largo, ancho, alto) que se cubrieron con una tapa para asegurar la hermeticidad, con dos orificios de 5 mm de diámetro en el centro de dos de los lados para permitir el intercambio de gases entre la atmósfera interior y el entorno [22] (Figura 2).



Figura 2. Reactores utilizados para los ensayos de biodegradación.

Las condiciones de ensayo utilizadas fueron modificadas con respecto a las indicadas en la norma UNE-EN ISO 20200 [22], dado que se observó que el material desarrollado presentaba una alta capacidad de degradación. De este modo, en el presente trabajo se realizó un periodo de incubación a una temperatura de 25 °C para permitir el desarrollo de los microorganismos que crecen a temperatura ambiente (mesófilos). Además, los tiempos de incubación fueron muy cortos por la alta velocidad de desintegración del material.

En el reactor se introdujeron las muestras cortadas en piezas rectangulares (2 x 3 cm²), poniendo cada trozo en un contenedor de malla de acero inoxidable para permitir el contacto directo con el suelo y una fácil recuperación del material para su inspección visual a diferentes tiempos de ensayo. Dichas mallas de acero conteniendo las muestras se enterraron a una profundidad de 8 cm, basándose en trabajos anteriores [23]. Se prepararon tres reactores, retirándose una muestra de cada uno de ellos para poder realizar ensayos por triplicado a los distintos tiempos de reacción: 10 min, 25 min, 80 min, 120 min, 240 min y 300 min.

Tabla III. Características del compost utilizado.

Enmienda Orgánica Húmica (Femabon)	
Materia Orgánica Total	25 %
Extracto Húmico Total	7,5 %
Ácidos Húmicos	5,5 %
Humedad máxima (para polvo)	40 %
Humedad máxima (para granulado y peletizado)	14 %
Humedad mínima (para polvo, granulado y peletizado)	10 %
Carbono Orgánico	18,5 %
pH	7,2
Conductividad eléctrica (dS/m)	10,5
Relación C/N	15

3.11. Plan de trabajo

Para poder alcanzar los objetivos planteados en el presente trabajo, se establecieron una serie de etapas a desarrollar durante la investigación que se detallan a continuación:

1) Búsqueda Bibliográfica:

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer el estado actual sobre el desarrollo de biopelículas en base proteica para envasado de alimentos. Para ello se llevó a cabo una recopilación de la información necesaria, centrada en publicaciones relevantes y recientes, relacionadas con las metodologías analíticas a utilizar y con el tema de la presente investigación.

2) Caracterización de los materiales de partida:

En esta fase se llevaron a cabo los ensayos de caracterización de la proteína láctea (caseinato de sodio y caseinato de calcio), plastificante (glicerol) y el agente antimicrobiano (carvacrol) que sirvieron de base para conocer los cambios inducidos en la matriz tras la mezcla. Se llevó a cabo una caracterización térmica de dichos materiales mediante la realización de ensayos de TGA y DSC para conocer su estabilidad térmica; así como una caracterización estructural mediante FTIR para conocer en detalle la estructura química.

3) Obtención de biopelículas de caseinato de sodio y calcio:

Para la formulación de las biopelículas se optimizó la concentración de plastificante, de forma que se obtuvieran materiales con buenas propiedades para su aplicación en envasado de alimentos. Se prepararon biopelículas por disolución y posterior evaporación del disolvente (*casting*) con y sin la adición del agente antimicrobiano, de forma que pudieran compararse los resultados frente a muestras de referencia. Para ello, se disolvió la proteína en la cantidad necesaria de agua para que el peso final fuera 100g con posterior adición del plastificante en la proporción correspondiente a cada material. En las muestras con agente antimicrobiano (carvacrol), éste fue añadido en último lugar. Finalmente, se tomó una porción de la disolución en el recipiente adecuado para dejar evaporar el disolvente, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

4) Caracterización completa de las biopelículas obtenidas:

Se llevó a cabo la caracterización completa de todas las formulaciones obtenidas mediante técnicas de análisis estructural, óptico y térmico. También se determinaron sus propiedades mecánicas y de barrera. La caracterización estructural se llevó a cabo mediante la realización de ensayos de FTIR y SEM, que permitieron conocer en detalle las modificaciones en la estructura química y de superficie inducidas por la adición del plastificante y/o el agente antimicrobiano de los materiales empleados, así como verificar la homogeneidad de las muestras. Asimismo, se realizaron ensayos de medición de color para comprobar la transparencia de las muestras. La caracterización térmica se llevó a cabo mediante TGA y DSC, estudiando las propiedades de degradación de estos materiales y su comportamiento a altas temperaturas. Se determinaron las propiedades mecánicas de tracción en una dirección siguiendo procedimientos normalizados, con el fin de evaluar la ductilidad del material en función de la concentración del plastificante. Aquellas muestras que hasta aquí presentaron características dúctiles aceptables siguieron siendo analizadas. Por último las modificaciones en las propiedades de barrera como consecuencia de la plastificación se evaluaron mediante la determinación de OTR a través de las biopelículas.

5) Estudio de la actividad antimicrobiana de las biopelículas:

Se llevaron a cabo ensayos por contacto directo entre la película y el medio de cultivo inoculado (método de difusión de disco). El efecto antimicrobiano se evaluó por medición del halo de inhibición comparando con un control (película sin agente antimicrobiano).

6) Estudio de la influencia de la humedad relativa y tiempo de almacenaje:

Se llevó a cabo un seguimiento de la dependencia de las propiedades de las películas con el tiempo de almacena-

miento mediante ensayos mecánicos y microbiológicos periódicos en condiciones controladas de humedad y temperatura.

7) Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas óptimas obtenidas:

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se seleccionó la mejor formulación que representara un mejor compromiso entre las propiedades mecánicas y su acción antimicrobiana. Se estudió la biodegradabilidad de estos materiales, con el fin de comprobar su contribución a un menor impacto medioambiental.

3.11.1. Cronograma (realizado durante el periodo de Abril de 2010 a Enero de 2011).

Actividad	Abr	May	Jun	Jul	Ago
Busqueda Bibliográfica	x	x	x	x	x
Caracterización de los materiales		x	x		
Obtención y caracterización de las biopelículas		x	x	x	x
Realización de Informe de avances de la investigación					x
Estudio de la actividad antimicrobiana				x	x
Estudio de la influencia de la humedad relativa y tiempo de almacenaje				x	x
Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas					x
Realización de informe final y artículo					

Actividad	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene
Busqueda Bibliográfica	x	x	x	x	x
Caracterización de los materiales					
Obtención y caracterización de las biopelículas					
Realización de Informe de avances de la investigación		x			
Estudio de la actividad antimicrobiana					
Estudio de la influencia de la humedad relativa y tiempo de almacenaje					
Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas	x	x	x	x	x
Realización de informe final y artículo				x	x

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los materiales de partida

Con el fin de controlar la calidad de los materiales suministrados y conocer sus principales características relevantes para las tareas a desarrollar con posterioridad, se realizó una caracterización completa de los materiales de partida para la obtención de las biopelículas: proteínas lácteas (caseinato de sodio y caseinato de calcio), plastificante (glicerol) y el agente antimicrobiano (carvacrol).

4.1.1. Caracterización térmica

4.1.1.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

En las Figuras 3-6 se muestran las curvas de degradación, junto a sus correspondientes derivadas (DTG), obtenidas del análisis TGA para los materiales constituyentes de las biopelículas.

Para los dos tipos de caseinatos se observaron dos etapas en el proceso de degradación térmica (Figuras 3 y 4). La primera etapa corresponde a la pérdida de humedad y/o de volátiles, con una pérdida de peso significativa alrededor de 100 °C. Los caseinatos de calcio y de sodio presentan valores de temperatura inicial de degradación (T_0) 117 °C y 182 °C, respectivamente. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en los valores de la temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) en ambas etapas (Tabla IV). La segunda etapa de degradación de los caseinatos mostró un pico simétrico y un residuo final correspondiente a la presencia de componentes inorgánicos.

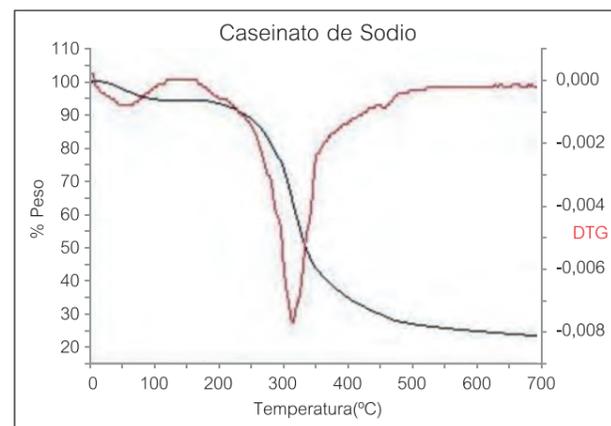


Figura 3. Termograma TG/DTG obtenido para caseinato de sodio.

En la Tabla IV se muestran los valores de T_0 y T_{max} para los materiales de partida. El valor de T_0 fue determinado como la temperatura a la cual se pierde un 5% del peso inicial del material al calentarlo a 10 °C min⁻¹ y T_{max} fue determinada a partir de los máximos de las curvas DTG tanto para la primera como para la segunda etapa de la degradación.

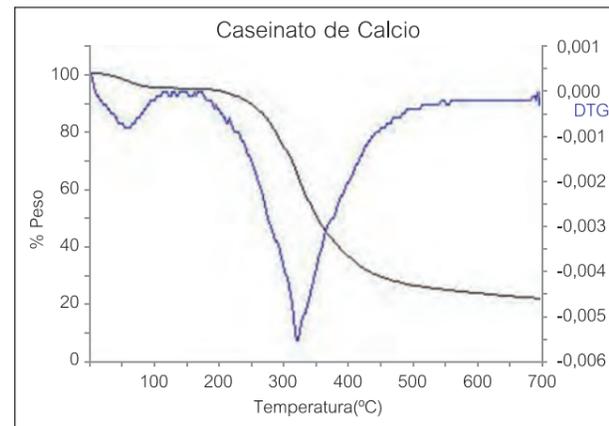


Figura 4. Termograma TG/DTG obtenido para caseinato de calcio.

Tabla IV. Temperatura inicial de degradación (T_0) y temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) de los materiales de partida.

Material	T_0 (°C)	T_{max} (°C) Etapa I	T_{max} (°C) Etapa II
Caseinato de sodio	117	87	330
Caseinato de calcio	182	87	338
Glicerol	203	269	-
Carvacrol	81	92	208

En la Figura 5 se muestran las curvas TGA y DTG del plastificante donde se observó una única etapa de degradación representada por un único pico, con un residuo final prácticamente despreciable.

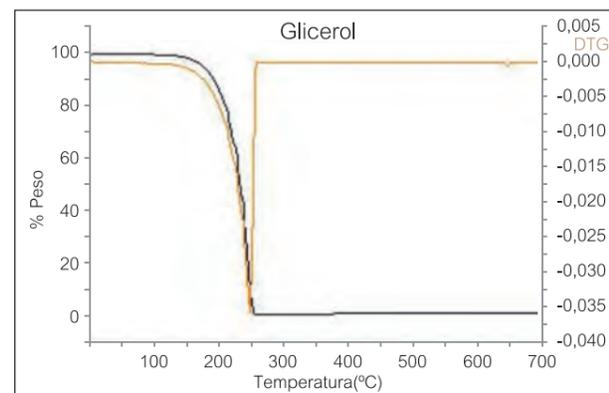


Figura 5. Termograma TG/DTG obtenido para glicerol.

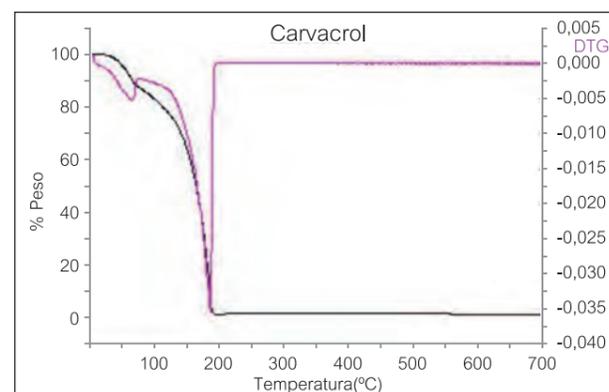


Figura 6. Termograma TG/DTG obtenido para carvacrol.

El análisis TGA del carvacrol reveló que éste degrada en dos etapas (Figura 6), la primera correspondiente al desprendimiento de sustancias volátiles y la segunda a la propia degradación del material, siendo despreciable el residuo tras la degradación.

4.1.1.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

A partir de los termogramas obtenidos para los caseinatos se pudo observar la presencia de un pico de carácter endotérmico durante el primer calentamiento que no apareció en el segundo calentamiento (Figuras 7 y 8), por lo cual se pudo concluir que este pico corresponde a la evaporación de agua.

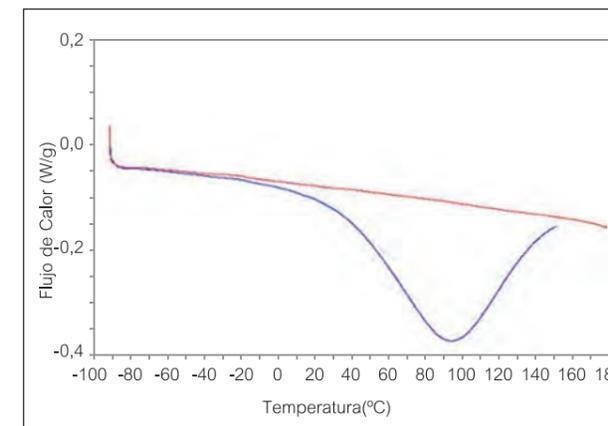


Figura 7. Termogramas DSC obtenidos para caseinato de sodio durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

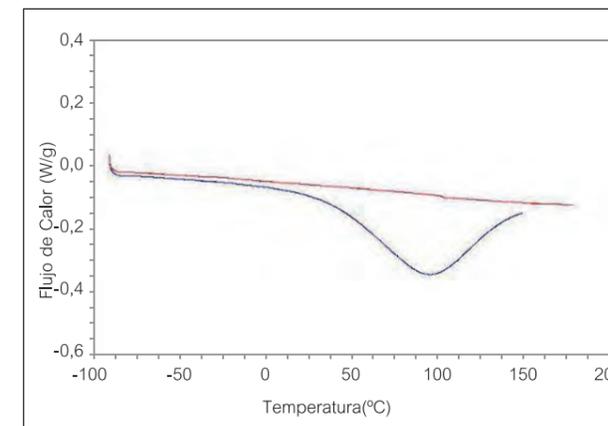


Figura 8. Termogramas DSC obtenidos para caseinato de calcio durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

En la Figura 9 se muestran las curvas DSC obtenidas durante el primer y segundo calentamiento para el glicerol, en las que se pudo observar un cambio en la línea base a -81 °C que se asoció a la temperatura de transición vítrea (T_g), siendo prácticamente la misma durante el primer y segundo calentamiento. Inmediatamente después de dicha temperatura se observó un pico endotérmico correspondiente a una relajación entálpica debida a la reordenación de las moléculas de glicerina tras su transición vítrea.

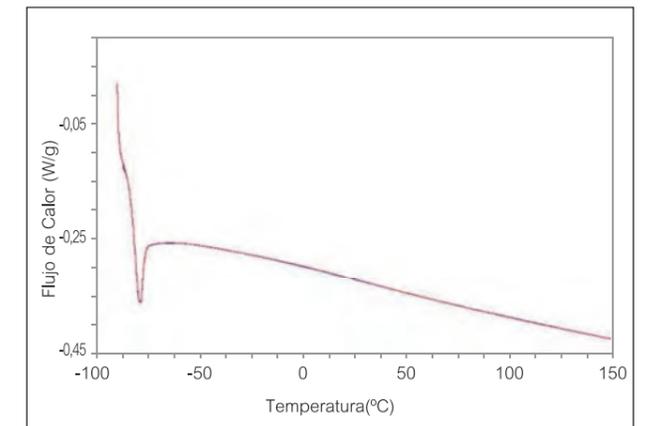


Figura 9. Termogramas DSC obtenidos para glicerol durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

La Figura 10 muestra el termograma DSC para el carvacrol, el cual presenta su valor de T_g a -63 °C, tanto en el primer como en el segundo calentamiento. Se observó también un pico exotérmico correspondiente a una cristalización fría a una temperatura de -22 °C. A temperaturas superiores (alrededor de -5 °C) se observó un pico endotérmico correspondiente a la fusión de los cristales formados en el carvacrol durante el propio ensayo. Es de destacar la presencia de un hombro en dicho pico, que parece indicar que la cristalización anterior ha dado lugar a dos tipos de cristales en la molécula de carvacrol.

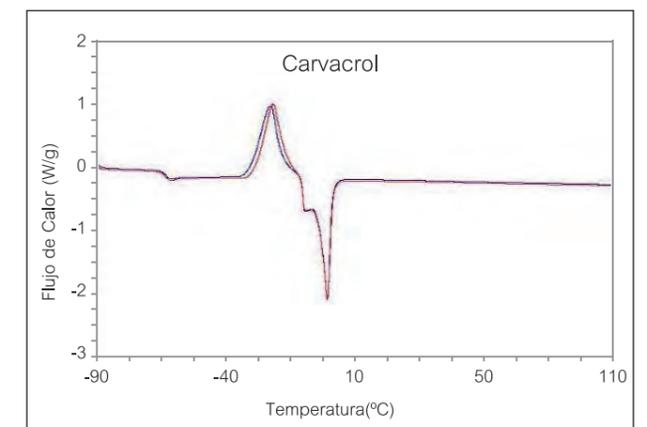


Figura 10. Termogramas DSC obtenidos para carvacrol durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

4.1.2. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 11 se muestra el espectro infrarrojo correspondiente al glicerol y en la Tabla V su correspondiente asignación de bandas. Se puede observar una banda de absorción amplia alrededor de 3270 cm⁻¹, asociada a los grupos hidroxilo del glicerol acoplada con la absorción característica de los alcoholes primarios y secundarios, la cual ocurre a 1030 y 1100 cm⁻¹, respectivamente.

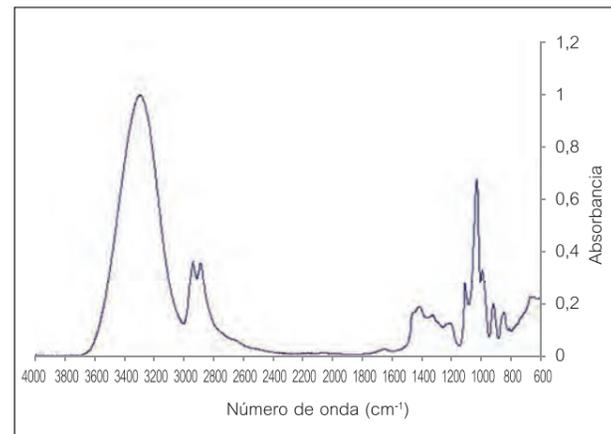


Figura 11. Espectro FTIR obtenido para glicerol.

Tabla V. Bandas de absorción identificadas para el espectro FTIR del glicerol.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación- Tipo de vibración
3650-3200	Tensión del enlace O-H
3000-2800	Tensión C-H
1400-1200	Deformación en el plano del O-H
1125-1000	Vibración CH-OH
1075-1000	Vibración CH ₂ -OH

En la Figura 12 se muestra el espectro correspondiente al carvacrol y en la Tabla VI su correspondiente asignación de bandas.

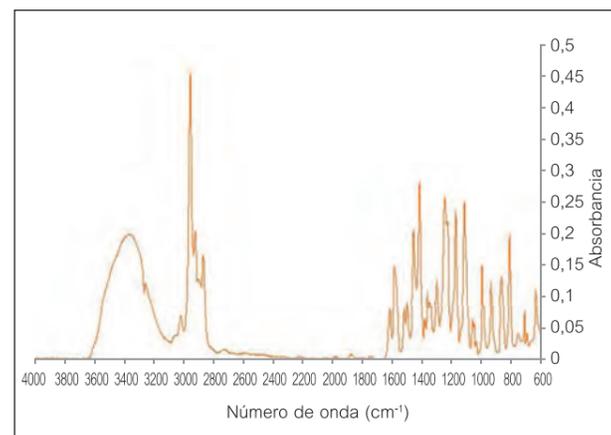


Figura 12. Espectro FTIR obtenido para carvacrol.

Tabla VI. Bandas de absorción identificadas para el espectro FTIR del carvacrol.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación- Tipo de vibración
3650-3200	Tensión del enlace O-H
2975-2845	Tensión simétrica y antisimétrica del enlace C-H
1480-1485	Deformación antisimétrica del -CH ₃

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación- Tipo de vibración
1385-1370	Deformación simétrica del -CH ₃
1340	Deformación (flexión) del -CH ₃
1275-1150	Vibración C-OH aromático
1250-950	Deformación en el plano del enlace C-H aromático.
650-900	Deformación fuera del plano del enlace C-H aromático.

En lo que se refiere a los caseinatos, en la Figura 13 se muestran sus espectros FTIR en los que se puede observar una banda ancha en la región de los enlaces NH en el intervalo entre 2000 y 3400 cm⁻¹ con varios picos superpuestos característicos de la absorción de los grupos funcionales en las proteínas. Las bandas que aparecen en la región 1600-1500 cm⁻¹ corresponden a las estructuras de amidas primarias y aminas secundarias respectivamente. Alrededor de 3450 cm⁻¹ aparecen las bandas correspondientes a las cadenas peptídicas aisladas [24], que se observaron más ensanchadas en la caseína cuajo. En la Tabla VII se indica la asignación de bandas correspondiente a estos materiales.

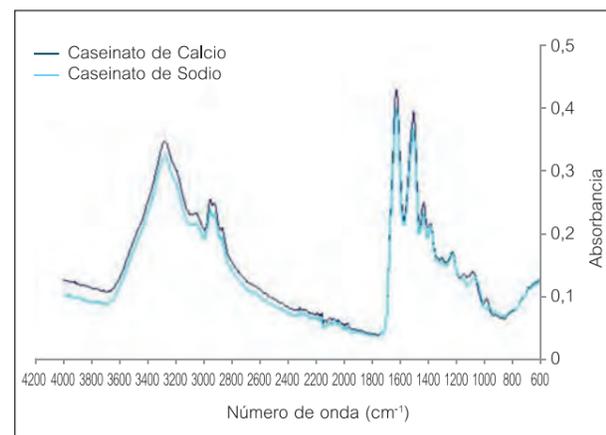


Figura 13. Espectros FTIR obtenidos para caseinato de sodio y caseinato de calcio.

Tabla VII. Bandas de absorción identificadas para los espectros FTIR de caseína cuajo y caseinatos (de sodio y calcio).

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación- Tipo de vibración
3400-2000	Tensión del enlace -NH, aminoácidos
1740-1630	Tensión del enlace C=O, de Amida I
1510-1630	Tensión simétrica del enlace N-C=O, de Amida II
1650-1590	Deformación del NH ₂
1650-1550	Deformación del NH
1110-930	Tensión del enlace P-N-C

5. OBTENCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

5.1. Optimización del método de obtención de las biopelículas

Para la preparación de las biopelículas se escogió el método de disolución del material con posterior evaporación del disolvente (*casting*). Con el objetivo de conseguir las condiciones más favorables de la solución formadora de las biopelículas se llevaron a cabo diferentes pruebas. En primer lugar, se intentó llevar a cabo su disolución a temperatura ambiente para posteriormente elevar la temperatura hasta la total disolución. También se hicieron pruebas variando las condiciones de secado (tiempo y temperatura). De esta forma, se pudieron extraer algunas conclusiones que ayudaron a decidir la metodología a seguir en este proceso. Finalmente, se decidió preparar las biopelículas tanto con caseinato de calcio como con caseinato de sodio para estudiar las diferencias y similitudes entre ambos polímeros. Se estableció que las biopelículas fueron secadas a 25 °C y 50 % de humedad relativa durante diferentes tiempos: 12; 24, 48 y 72 h. Los ensayos TGA durante la etapa de pérdida de agua y/o volátiles (alrededor de 100 °C) no mostraron diferencias significativas entre las biopelículas secadas durante 48 h y 72 h (Figura 14) por lo que se escogió como tiempo de secado 48 h.

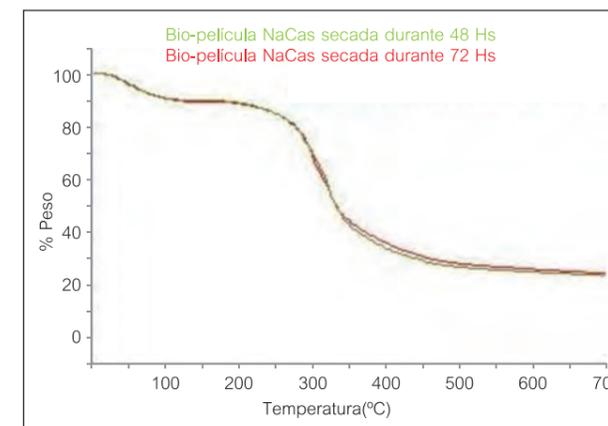


Figura 14. Termogramas TG/DTG obtenidos para dos biopelículas de caseinato de sodio a distintos tiempos de secado.

5.2. Preparación de las biopelículas

Las películas fueron preparadas disolviendo 5 g (con precisión de 0,0001g) de proteína láctea (caseinato de sodio o caseinato de calcio) en agua destilada, calentando hasta 65 °C para facilitar su solubilización. Posteriormente se homogeneizaron bajo agitación continua durante 10 minutos a 1100 rpm. Tras la disolución total del polímero se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y se añadió la cantidad requerida de glicerol para obtener las siguientes relaciones proteína:plastificante, 1:0; 1:0,15; 1:0,25; 1:0,35. Una vez incorporado el plastificante, se homogeneizaron las soluciones durante 3 minutos a 1100

rpm y por último se sometieron a un tratamiento en baño de ultrasonidos durante 10 minutos para eliminar gases que pudieran haber quedado en disolución.

Se prepararon biopelículas con y sin agente antimicrobiano. En el primer caso, se agregó la cantidad de carvacrol necesaria para obtener la relación proteína:antimicrobiano: 1:0,10; con posterior agitación continua durante 3 minutos a 1000 rpm. Una vez preparadas las soluciones formadoras de biopelículas, se colocaron 30 mL de cada disolución en cápsulas de Petri de polietileno (15 cm de diámetro) y posteriormente se secaron a 25 °C y 50 % de humedad relativa durante 48 horas.

Las muestras obtenidas tras este tratamiento tanto de caseinato de sodio/glicerol (NaCas-G) como de caseinato de calcio/glicerol (CaCas-G) resultaron ser películas transparentes e inodoras, mientras que las muestras a las que se les adicionó carvacrol (CV) también resultaron transparentes pero no inodoras, percibiéndose un ligero olor característico a orégano (Figura 15).



Figura 15. Biopelículas de caseinato de sodio y glicerol (1:0,35) obtenidas sin (izquierda) y con carvacrol (derecha).

6. CARACTERIZACIÓN COMPLETA DE LAS BIOPELÍCULAS OBTENIDAS

Se llevó a cabo una caracterización completa de todas las formulaciones obtenidas mediante técnicas de análisis térmico, estructural y mecánico; así como mediante la evaluación de sus propiedades funcionales.

6.1. Caracterización estructural de las biopelículas

Estas técnicas se utilizaron para conocer en detalle las modificaciones en la estructura química de los materiales empleados, comprobando la ausencia de separación de fases y la consiguiente homogeneidad de los materiales.

6.1.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de las biopelículas

6.1.1.1. FTIR de las biopelículas de caseinato de sodio

La Figura 16 muestra los espectros FTIR obtenidos a partir de las biopelículas de caseinato de sodio sin glicerol,

así como con 15%, 25% y 35% de este plastificante. Al observar la región comprendida entre 600 y 1800 cm^{-1} (Figura 17) se vio claramente que a medida que se aumentaba la proporción de glicerol en las biopelículas disminuía la intensidad de los picos que se encontraban presentes en el caseinato de sodio. Así, para el material sin glicerol, se observó un único pico a 1070 cm^{-1} , que probablemente esté asociado a la vibración del enlace correspondiente P-N-C, mientras que para las otras tres biopelículas se observaron dos picos alrededor de 1030 y 1100 cm^{-1} que corresponden a la absorción característica de los alcoholes primarios y secundarios, ya que además aumentaban su intensidad a medida que lo hacía la proporción de glicerol. En cambio, las bandas características de las amidas primarias y secundarias (1600-1500 cm^{-1} respectivamente) disminuyeron a medida que aumentó la proporción de glicerol. A la vista de estos resultados se puede concluir que la unión de los caseinatos con el glicerol provoca la ruptura y recombinación de enlaces químicos en la estructura del polímero.

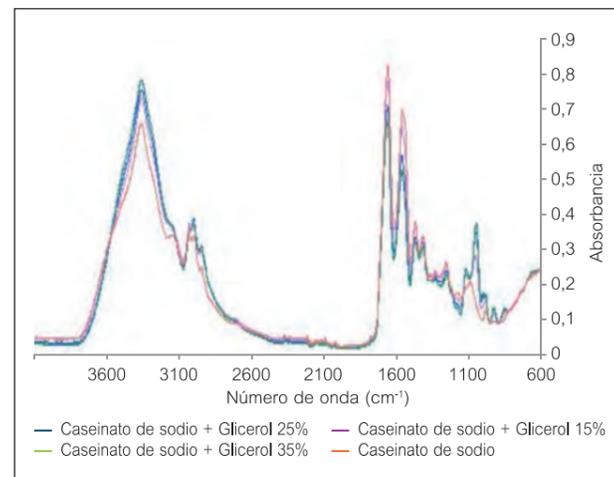


Figura 16. Espectros FTIR de las biopelículas de caseinato de sodio con 0% 15%,25% y 35% de glicerol.

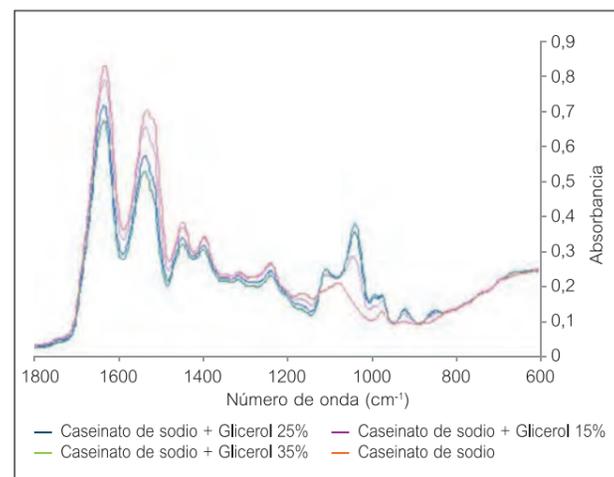


Figura 17. Espectros FTIR de las biopelículas de caseinato de sodio con 0%, 15%,25% y 35% de glicerol en la región de 600-1800 cm^{-1}

En la región del espectro correspondiente a las vibraciones CH se observó un aumento en la proporción del pico correspondiente a los grupos metileno ($-\text{CH}_2$) (2925 cm^{-1}) para las biopelículas plastificadas (Figura 18). Al añadir carvacrol a estas formulaciones no se observaron cambios apreciables en sus espectros FTIR, probablemente debido a que este aditivo muestra absorciones en la región del infrarrojo muy similares tanto a las del glicerol como a las de los caseinatos.

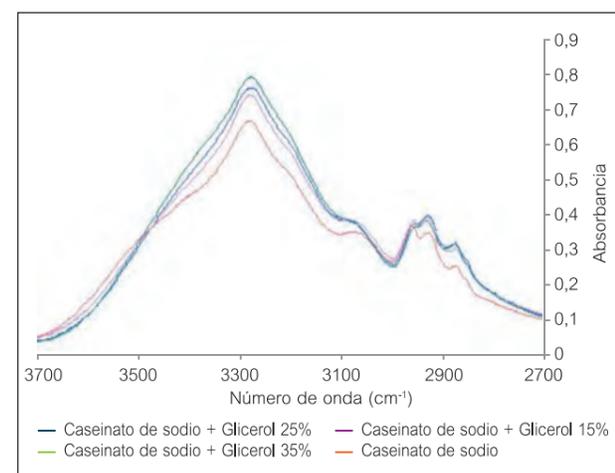


Figura 18. Espectros FTIR de las biopelículas de caseinato de sodio con 0%, 15%,25% y 35% de glicerol en la región de 2700-3700 cm^{-1} .

6.1.1.2. FTIR de las biopelículas de caseinato de calcio

Al igual que en el caso de las biopelículas de caseinato de sodio, se pudo observar que para las de caseinato de calcio plastificado los picos característicos de los alcoholes primarios y secundarios (1030 y 1100 cm^{-1}) aumentaron de intensidad a medida que lo hizo la proporción de plastificante en la formulación (Figura 19). En este caso tampoco se observaron cambios apreciables en sus espectros FTIR al añadir el agente antimicrobiano.

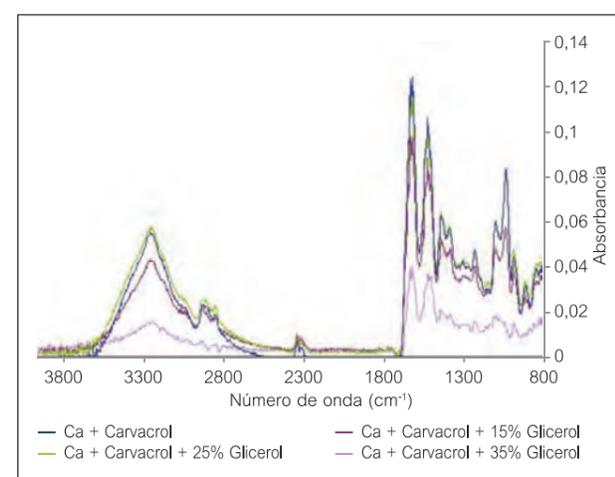


Figura 19. Espectros FTIR de las biopelículas de caseinato de calcio con carvacrol, con 0%, 15%,25% y 35% de glicerol.

6.1.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las biopelículas

Se realizaron micro-fotografías de las muestras a magnificaciones de 500x y 1000x. Todas las muestras mostraron una microestructura de superficie homogénea, lo que indica una buena dispersión del plastificante en la matriz polimérica ya que no se observó dispersión ni formación de dos fases.

En la Figura 20 se muestran las imágenes obtenidas para las películas preparadas con caseinato de sodio con y sin glicerol. Tal como se puede observar, las películas con un 25% en peso de glicerol presentaron una estructura agrietada, lo cual puede indicar algún tipo de interacción entre los distintos componentes durante el procesado, aunque este resultado no es concluyente para hacer esta afirmación de modo definitivo.

En la Figura 21 se puede observar la sección transversal de una biopelícula sin plastificante y otra con la mayor cantidad de plastificante utilizada en el presente trabajo (35 % en peso de glicerol), donde se puede observar la presencia de pequeñas burbujas que no se pueden relacionar con la adición de glicerol, ya que también aparecen en las películas no plastificadas.

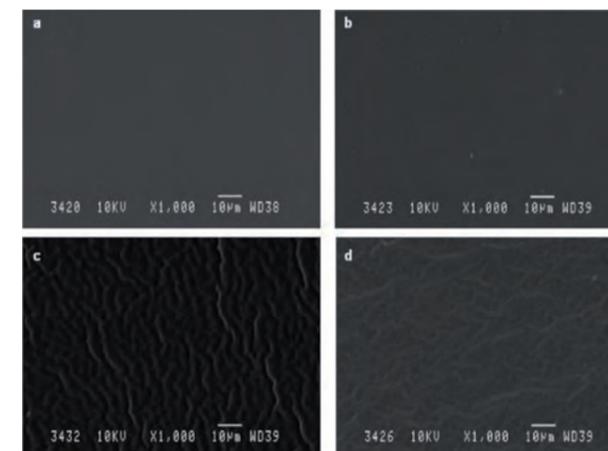


Figura 20. Micrografías (SEM) 1000x de la superficie de las películas de caseinato de sodio (a) sin glicerol; (b-d) con glicerol (b: 15 %; c: 25 %; d: 35 %).

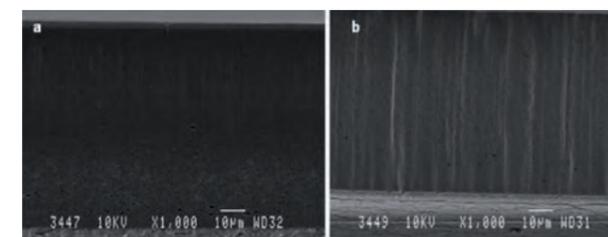


Figura 21. Micrografías (SEM) 1000x de la sección transversal de las películas de caseinato de sodio (a) sin glicerol; (b) 35 % de glicerol.

Las biopelículas preparadas con caseinato de calcio con o sin glicerol mostraron una microestructura homogénea, regular y lisa (Figuras 22 y 23).

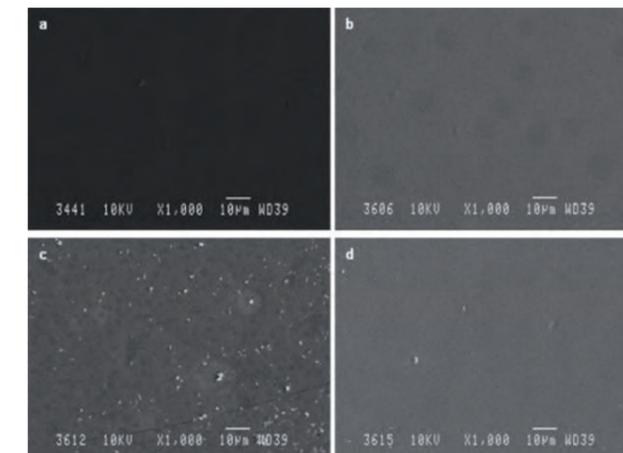


Figura 22. Micrografías (SEM) 1000x de la superficie de las películas de caseinato de calcio (a) sin glicerol; (b-d) con glicerol (b: 15 %; c: 25 %; d: 35 %).

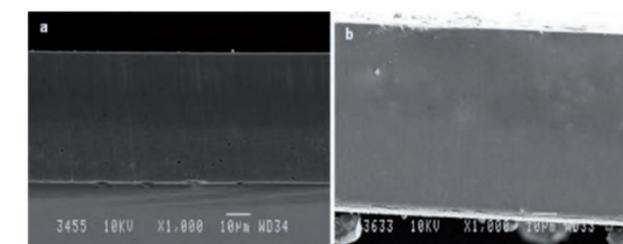


Figura 23. Micrografías (SEM) 1000x de la sección transversal de las películas de caseinato de calcio (a) sin glicerol; (b) 35% de glicerol.

En cuanto a las películas con carvacrol, se observó que éstas presentan una estructura homogénea (Figuras 24 y 25) indicando que el carvacrol se incorporó adecuadamente a la matriz proteica.

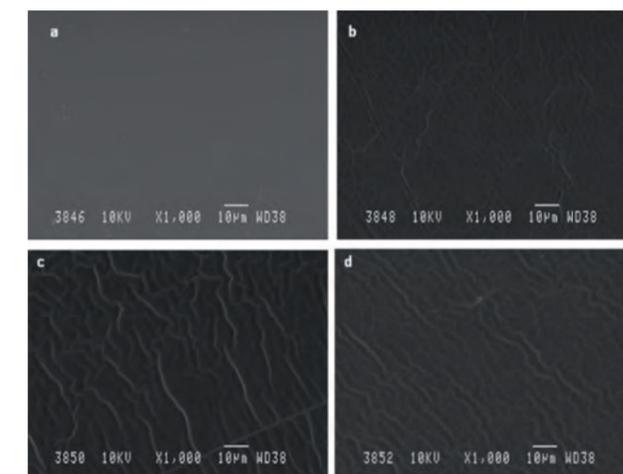


Figura 24. Micrografías (SEM) 1000x de la superficie de las películas de caseinato de sodio, con un 10% de carvacrol. (a) sin glicerol; (b-d) con glicerol (b: 15 %; c: 25 %; d: 35 %).

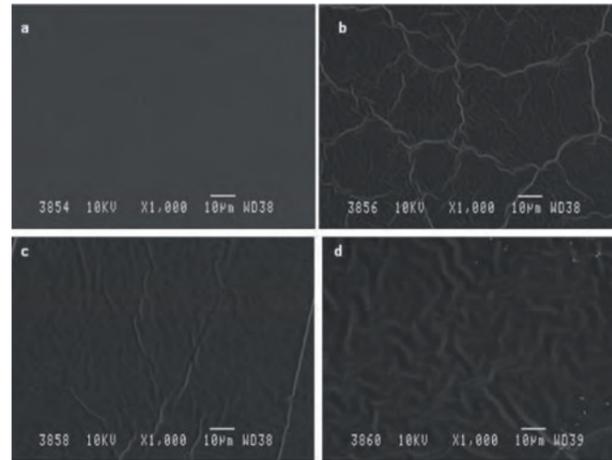


Figura 25. Micrografías (SEM) 1000x de la superficie de las películas de caseinato de calcio con un 10% de carvacrol. (a) sin glicerol; (b-d) con glicerol (b: 15 %; c: 25 %; d: 35 %).

6.2. Caracterización térmica de las biopelículas

En este apartado se muestran los resultados obtenidos para el estudio de las propiedades de degradación de las biopelículas y en general, su comportamiento a altas temperaturas.

6.2.1. Análisis termogravimétrico (TGA) de las biopelículas

Con el fin de conocer las variaciones del comportamiento a altas temperaturas de estos nuevos materiales y su resistencia a la degradación térmica, se analizó el efecto de los distintos porcentajes de plastificante sobre la estabilidad térmica de los caseinatos y la estabilidad del agente antimicrobiano elegido (carvacrol).

En la Figura 26 se muestran las curvas TGA para los materiales de partida (caseinato, glicerol y carvacrol) y algunas biopelículas con plastificante (glicerol) y/o carvacrol. Para todas las formulaciones obtenidas se observó inicialmente un salto en la curva asociado a la pérdida de agua y al inicio de la degradación del carvacrol entre 100 °C y 150 °C, mientras que posteriormente se observaron las etapas típicas de los procesos de degradación del glicerol (entre 200 °C y 250 °C) y más tarde del caseinato a una temperatura superior a 350 °C.

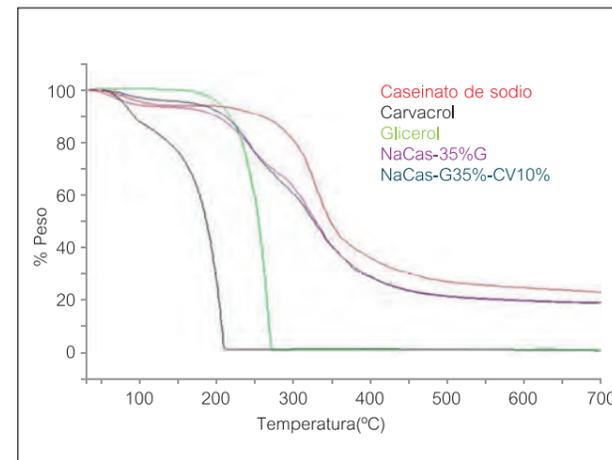


Figura 26. Termogramas obtenidos para dos formulaciones de biopelículas y sus componentes.

Los resultados obtenidos para los análisis mediante TGA de las biopelículas preparadas se muestran en las tablas VIII-XI. Tal como se puede observar, la degradación de los caseinatos es el proceso que predomina a temperaturas superiores a 300 °C. Los procesos de evaporación del plastificante y del agente activo se superponen ligeramente con el inicio de la degradación.

Tabla VIII. Temperatura inicial de degradación (T_0), temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) de tres regiones y peso residual a 900 °C de las biopelículas de caseinato de sodio y glicerol.

Biopelículas de Caseinato de Sodio + Glicerol		Proporciones (NaCas:Glicerol)			
Parámetros termogravimétricos		(1 : 0)	(1 : 0,15)	(1 : 0,25)	(1 : 0,3 5)
T_0 (°C)		90	101	170	97
Región I	T intervalo (°C)	30-164	30-142	30-128	30-128
	Tmax (°C)	78	78	84	69
Región II	Tinicio (°C)	191	193	154	152
	Tmax (°C)	314	323	249	244
Región III	Tinicio (°C)	-	335	275	284
	Tmax (°C)	-	347	320	326
Peso residual a 900 °C (%)		6,7	7,0	3,7	5,4

Tabla IX. Temperatura inicial de degradación (T_0), temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) de tres regiones y peso residual a 900 °C de las biopelículas de caseinato de calcio y glicerol.

Biopelículas de Caseinato de Calcio + Glicerol		Proporciones (CaCas:Glicerol)			
Parámetros termogravimétricos		(1 : 0)	(1 : 0,15)	(1 : 0,25)	(1 : 0,3 5)
T_0 (°C)		89	116	169	149
Región I	T intervalo (°C)	30-160	30-154	30-126	30-116
	Tmax (°C)	81	101	83	70
Región II	Tinicio (°C)	199	169	135	116
	Tmax (°C)	338	287	232	220
Región III	Tinicio (°C)	-	287	285	280
	Tmax (°C)	-	332	330	341
Peso residual a 900 °C (%)		5,0	5,3	7,0	5,2

Tabla X. Temperatura inicial de degradación (T_0), temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) de tres regiones y peso residual a 900 °C de las biopelículas de caseinato de sodio, carvacrol y glicerol.

Biopelículas de Caseinato de Sodio + Carvacrol + Glicerol		Proporciones (NaCas : Carvacrol : Glicerol)			
Parámetros termogravimétricos		(1:0,1:0)	(1:0,1:0,15)	(1:0,1:0,25)	(1:0,1:0,35)
T_0 (°C)		98	99	107	104
Región I	T intervalo (°C)	30-140	30-131	30-121	30-104
	Tmax (°C)	81	81	69	69
Región II	Tinicio (°C)	164	155	151	157
	Tmax (°C)	335	272	243	243
Región III	Tinicio (°C)	-	287	279	280
	Tmax (°C)	-	326	320	320
Peso residual a 900 °C (%)		5,2	3,8	5,0	1,9

Tabla XI. Temperatura inicial de degradación (T_0), temperatura de máxima velocidad de degradación (T_{max}) de tres regiones y peso residual a 900 °C de las biopelículas de caseinato de calcio, carvacrol y glicerol.

Biopelículas de Caseinato de calcio + Carvacrol + Glicerol		Proporciones (CaCas : Carvacrol : Glicerol)			
Parámetros termogravimétricos		(1:0,1:0)	(1:0,1:0,15)	(1:0,1:0,25)	(1:0,1:0,3 5)
T_0 (°C)		99	116	105	161
Región I	T intervalo (°C)	30-152	30-161	30-152	30-111
	Tmax (°C)	76	107	93	76
Región II	Tinicio (°C)	190	175	143	140
	Tmax (°C)	335	338	265	244
Región III	Tinicio (°C)	-	356	287	290
	Tmax (°C)	-	362	335	335
Peso residual a 900 °C (%)		6,0	5,3	4,1	6,1

6.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las biopelículas

En las curvas DSC de algunas de las biopelículas preparadas en el presente trabajo se pudo observar claramente durante el primer calentamiento un pico endotérmico próximo a los 100 °C causado por la evaporación del agua presente en la matriz. Durante el segundo calentamiento dicho pico no se observó debido a que el agua ya fue eli-

minada con anterioridad. Si bien no se pudo determinar con precisión el valor de T_g en estas muestras, si se pudo comprobar que para los casos en los que las biopelículas fueron mezcladas con el plastificante, éstas presentaron un ligero cambio en la línea base a una temperatura de -57 °C que podría corresponder a la T_g del sistema al ser, por otra parte, algo superior al valor de temperatura de transición vítrea observada para el propio plastificante (Figuras 27-30).

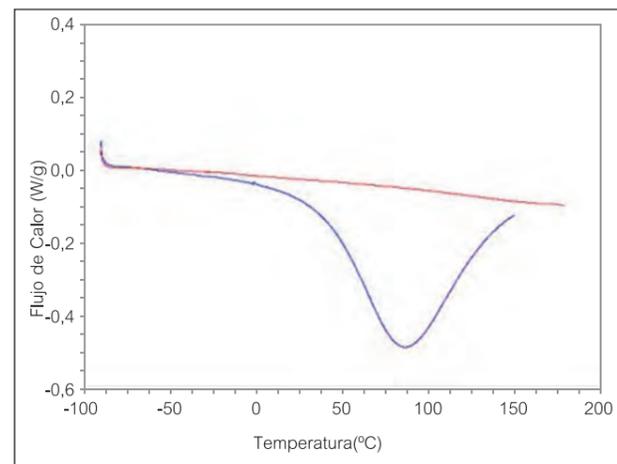


Figura 27. Termogramas DSC obtenidos para una biopelícula de caseinato de calcio durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

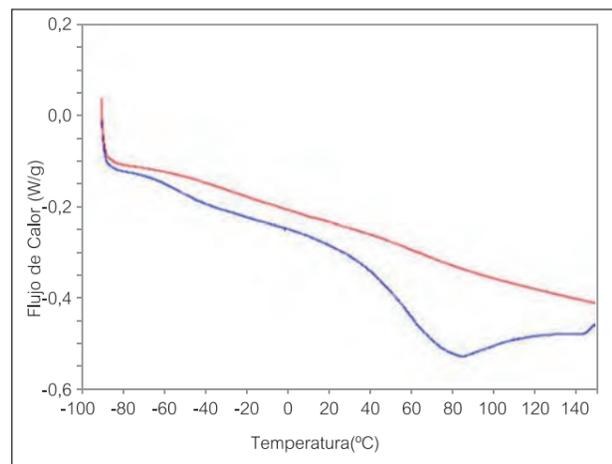


Figura 30. Termogramas DSC obtenidos para una biopelícula de caseinato de sodio con un 35% de glicerol y 10% carvacrol durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

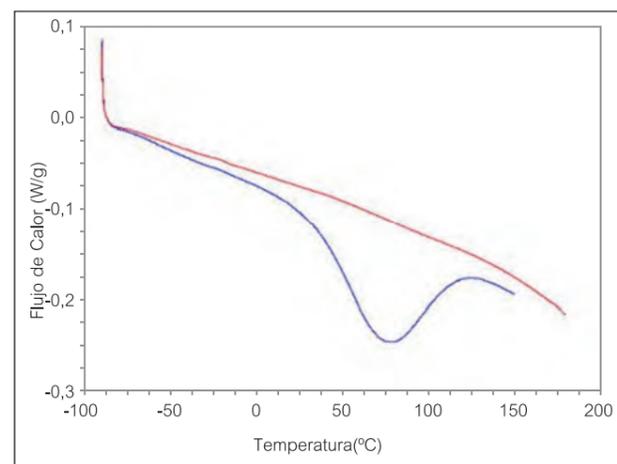


Figura 28. Termogramas DSC obtenidos para una biopelícula de caseinato de calcio con 35% de glicerol durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

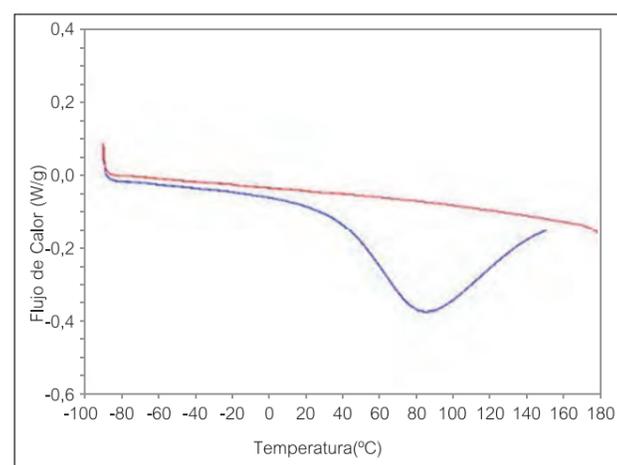


Figura 29. Termogramas DSC obtenidos para una biopelícula de caseinato de sodio con 10% de carvacrol durante el primer (---) y segundo (---) calentamiento.

6.3. Caracterización óptica de las biopelículas

Para la realización del ensayo de medición de color se colocaron las biopelículas sobre el sensor del instrumento de medida y se tomaron cinco medidas en diferentes puntos. La Tabla XII muestra un promedio de cada una de las medidas y sus respectivas desviaciones estándar para todas las formulaciones.

Tabla XII. Coordenadas de color del espacio CIELAB de las biopelículas formuladas (n = 5).

Biopelículas	L*	DS	a*	DS	b*	DS
NaCas	35,40	0,20	-0,33	0,09	-1,10	0,10
NaCas-G15%	34,30	0,07	-0,10	0,10	-0,88	0,03
NaCas-G25%	34,28	0,05	-0,24	0,04	-0,81	0,05
NaCas-G35%	33,83	0,08	-0,13	0,03	-0,69	0,04
CaCas	35,00	0,10	-0,12	0,09	-0,82	0,03
CaCas-G15%	34,60	0,02	-0,10	0,05	-0,67	0,02
CaCas-G25%	34,50	0,07	-0,15	0,05	-0,72	0,08
CaCas-G35%	34,10	0,09	-0,09	0,03	-0,61	0,04
NaCas-CV10%	35,61	0,08	-0,56	0,08	-1,08	0,06
NaCas-G15%-CV10%	34,71	0,06	-0,37	0,06	-1,30	0,10
NaCas-G25%-CV10%	34,64	0,05	-0,30	0,03	-0,96	0,05
NaCas-G35%-CV10%	33,78	0,03	-0,17	0,06	-0,72	0,06
CaCas-CV	34,80	0,07	-0,14	0,06	-0,67	0,04
CaCas-G15%-CV10%	34,68	0,04	-0,12	0,06	-0,57	0,04
CaCas-G25%-CV10%	34,20	0,10	-0,10	0,04	-0,61	0,04
CaCas-G35%-CV10%	33,90	0,05	-0,08	0,02	-0,52	0,05

Se pudo observar que la evolución de la luminosidad L* mostraba un ligero descenso con el aumento en la proporción del plastificante, por lo que se puede concluir que las biopelículas al estar más plastificadas se hacen ligeramente más transparentes. Tanto para el índice de saturación a*, como para el ángulo de tono b*, se observaron valores ligeramente inferiores a cero, desviándose, por lo tanto levemente hacia el color verde y azul, respectivamente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los valores absolutos de los parámetros a* y b* fueron muy cercanos a 0.

6.4. Caracterización mecánica de las biopelículas

Las Figuras 31 y 32 muestran los resultados comparativos para las propiedades de los ensayos de tracción (módulo elástico y tensión en el punto de rotura) de las biopelículas.

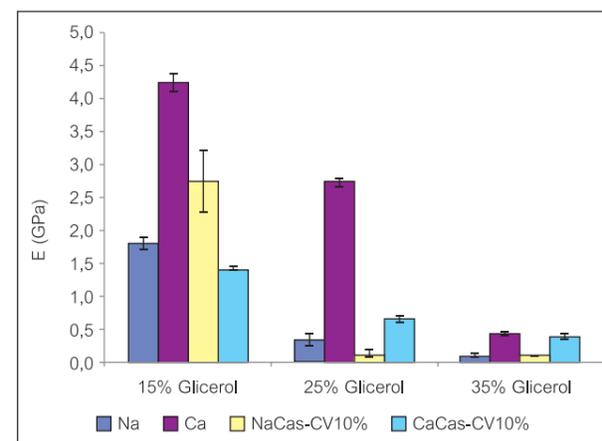


Figura 31. Módulo elástico de Young obtenido para las distintas biopelículas (n = 5).

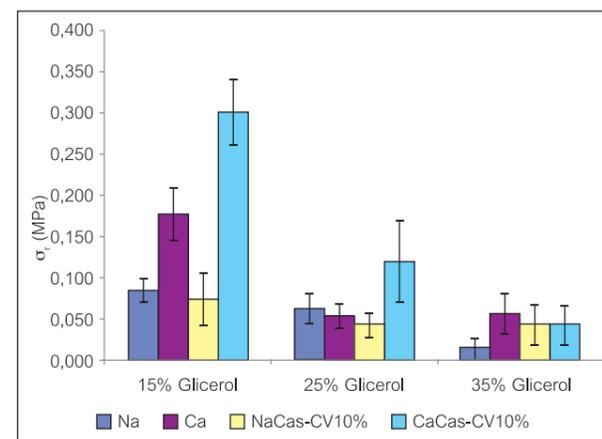


Figura 32. Tensión en el punto de rotura obtenida (σ_r) para las biopelículas (n = 5).

Como era de esperar al tratarse de un proceso de plastificación, la adición de glicerol en la máxima proporción utilizada (35 % en peso) provocó una disminución importante en el módulo elástico de Young para todas las biopelículas, lo que implica una disminución de la rigidez del material plastificado (Figura 31).

En cuanto a la deformación en el punto de rotura, se puede observar en la Figura 33 que un aumento en la proporción de plastificante mejoró la flexibilidad de todas las biopelículas. En particular las de caseinato de sodio con un 35 % en peso de glicerol son las que presentaron el incremento más elevado de ε_b % (alrededor de un 80 %) tanto para las películas sin carvacrol como con un 10 % de este aditivo. Este resultado es importante desde el punto de vista práctico ya que para la fabricación de películas es necesario que el valor de ε_b sea lo más alto posible, demostrando así la flexibilidad del material.

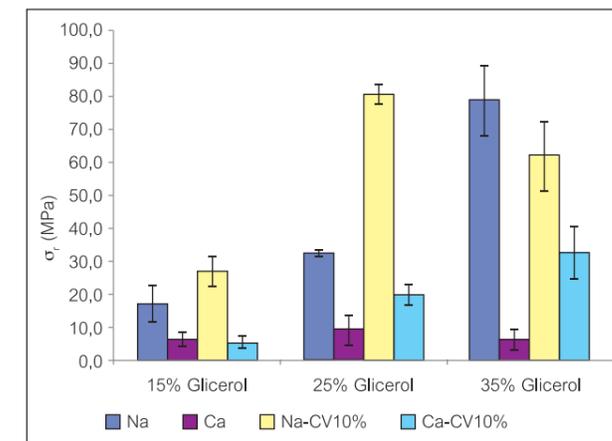


Figura 33. Porcentaje de deformación a la rotura (ε_b %) obtenido para las biopelículas (n = 5).

Teniendo en cuenta que la flexibilidad del material es una propiedad clave en la fabricación de películas para envasado de alimentos, para proceder a las siguientes etapas del plan de trabajo se seleccionaron las formulaciones con un 25 % y 35 % en peso de glicerol, con y sin carvacrol. Se siguieron estudiando tanto las formulaciones de caseinato de sodio como las de caseinato de calcio.

6.5. Propiedades de barrera al oxígeno

Las Tablas XIII y XIV muestran los valores finales de OTR en el estado estacionario multiplicado por el espesor promedio de cada película (OTR.e), obtenidos para las biopelículas de caseinato de sodio y calcio, cuyos espesores promedio estuvieron en el intervalo 88 ± 16 μm y en el intervalo de 103 ± 11 μm respectivamente.

En todos los casos, los valores de OTR.e obtenidos fueron muy bajos, indicando que las biopelículas presentan excelentes propiedades de barrera al oxígeno y en consecuencia demostrando su utilidad como envase para los alimentos en los que se deba restringir la presencia de oxígeno con el fin de limitar los procesos oxidativos.

Por otro lado, se observó que la adición del agente antimicrobiano produjo un leve aumento en el valor de OTR.e de las biopelículas, disminuyendo ligeramente sus propiedades de barrera a oxígeno. Sin embargo, al ser este incremento poco significativo, se puede concluir que las propiedades de barrera son muy adecuadas para su uso como material de envasado activo de alimentos en todos los casos ensayados.

Tabla XIII. Velocidades de transmisión de oxígeno por espesor promedio de muestra (OTR.e) obtenidas para las películas de caseinato de sodio (n = 2).

Biopelículas	OTR.e (cm ³ mm / m ² día)	DS
NaCas-G25%	1,87	0,01
NaCas-G35%	1,4	0,3
NaCas-G25%-CV	2,42	0,02
NaCas-G35%-CV	2,1	0,7

Tabla XIV. Velocidades de transmisión de oxígeno por espesor promedio de muestra (OTR.e) obtenidas para las películas de caseinato de calcio (n = 2).

Biopelículas	OTR.e (cm ³ mm / m ² día)	DS
CaCas-G25%	7,12	0,01
CaCas-G35%	4,4	0,3
CaCas-G25%-CV	4,57	0,09
CaCas-G35%-CV	1,2	0,3

6.6. Estudio de la actividad antibacteriana de las biopelículas

Se sembraron en placas de agar nutriente las bacterias indicadoras elegidas (*S. aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento de las colonias (Figura 34). De las colonias obtenidas tras este tratamiento se seleccionaron de tres a cinco de ellas bien aisladas y con similar morfología, las cuales fueron extraídas del agar de cultivo y transferidas con un asa a un tubo con caldo de triptonsoja. Los inóculos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron la turbidez del estándar de 0,5 McFarland, aproximadamente tras 5 horas de tratamiento. De este modo se obtuvo una suspensión con aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹. Con el fin de obtener una concentración final de microorganismos del orden de 10⁶ UFC mL⁻¹ se prepararon dos diluciones en serie (1/10) en agua peptonada. Una vez obtenida la concentración de microorganismos deseada, se procedió a inocular 0,1 mL sobre la superficie de cada placa de agar Mueller Hinton y su inmediata distribución del inóculo por rayado con un asa de Digrosky sobre toda la superficie por dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60 ° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo.

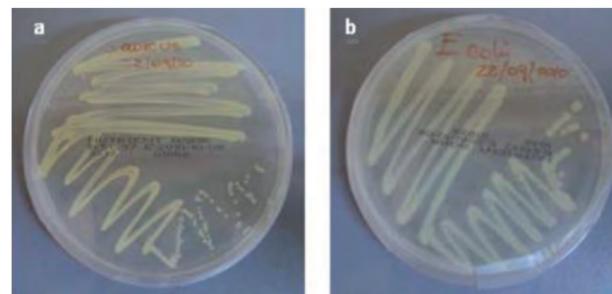


Figura 34. Placas de Petri conteniendo las bacterias utilizadas a) *S. aureus*, b) *E. coli*

Se cortaron las biopelículas en forma de cuadrados de 10 x 10 mm² y se colocaron presionándolos de forma que se asegurara un contacto pleno con la superficie del agar. Se prepararon entonces tres cuadrados por placa, las cuales fueron duplicadas para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Se pudo observar que todas las biopelículas cuyas formulaciones contenían carvacrol mostraron una inhibición del crecimiento bacteriano en la zona de contacto

(Figuras 35 y 36), mientras que para las biopelículas utilizadas como control (sin carvacrol en su formulación) se observó el crecimiento bacteriano en toda la superficie de la placa (Figura 37). Por lo tanto, se puede concluir que las biopelículas con un 10% de carvacrol presentaron actividad antimicrobiana tanto frente a la cepa de *S. aureus* como para *E. coli*.

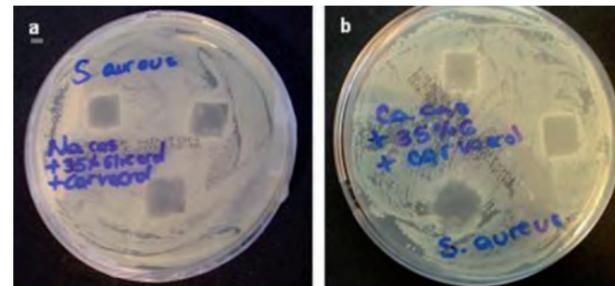


Figura 35. Inhibición del crecimiento de *S. aureus*. a) Biopelícula de caseinato de sodio, glicerol y carvacrol (1: 0,35: 0,1). b) Biopelícula de caseinato de calcio, glicerol y carvacrol (1: 0,35: 0,1).

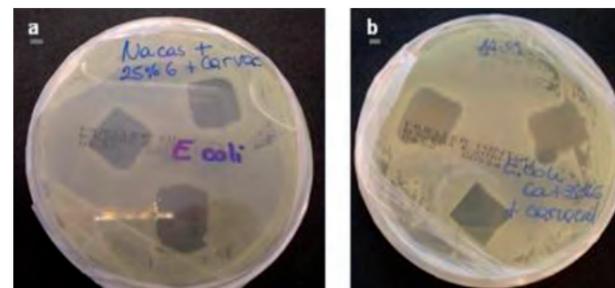


Figura 36. Inhibición del crecimiento de *E. coli*. a) Biopelícula de caseinato de sodio, glicerol y carvacrol (1: 0,25: 0,1). b) Biopelícula de caseinato de calcio, glicerol y carvacrol (1: 0,35: 0,1).

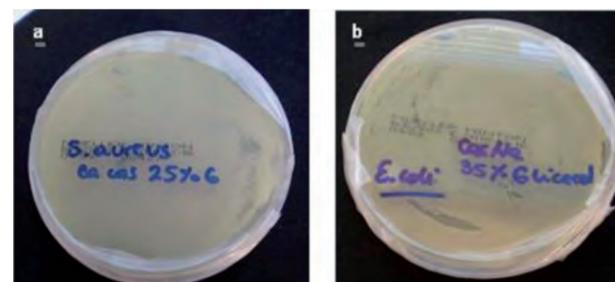


Figura 37. Crecimiento de a) *S. aureus* y b) *E. coli* en biopelículas control a) caseinato de calcio y glicerol (1: 0,25) y b) caseinato de sodio y glicerol (1: 0,35)

6.7. Estudio de la influencia del tiempo de almacenamiento

Tras preparar todas las biopelículas necesarias para el estudio, se almacenaron en una cámara climática a 25 °C y 50 % de humedad relativa, siendo posteriormente retiradas para su análisis a diferentes tiempos: 7, 14, y 21 días. Se llevaron a cabo los mismos ensayos antimicrobianos

para comprobar si las biopelículas conservan o pierden su capacidad antimicrobiana en el tiempo mencionado. Asimismo, se estudiaron también las propiedades mecánicas a tracción para evaluar un posible cambio en la respuesta elástica y plástica del material.

6.7.1. Estudio de la actividad antibacteriana de las biopelículas durante el almacenamiento

Para todas las biopelículas conteniendo carvacrol, tanto de caseinato de sodio como de caseinato de calcio, se observó que se mantiene la inhibición del crecimiento bacteriano a tiempos de almacenamiento 7, 14 y 21 días. A modo de ejemplo, se muestran algunas placas a distintos tiempos y de distintas biopelículas en las Figuras 38-40.

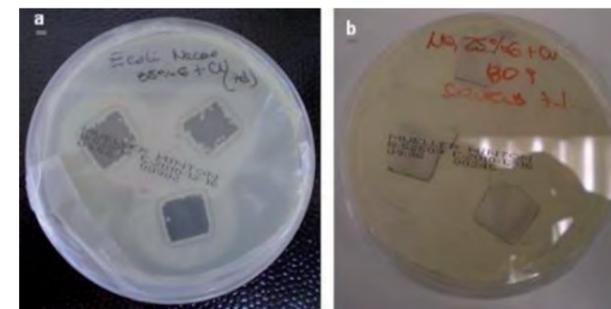


Figura 38. Biopelículas de caseinato de sodio, glicerol y carvacrol almacenadas durante 7 días a 25 °C y 50 % HR. Inhibición del crecimiento de a) *E. coli* y b) *S. aureus*.



Figura 39. Biopelículas de caseinato de sodio, glicerol y carvacrol (1: 0,25: 0,10) almacenadas durante 14 días a 25 °C y 50 % HR. Inhibición del crecimiento de *E. coli*.

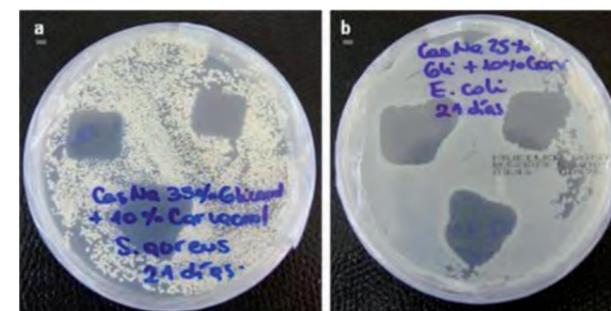


Figura 40. Biopelículas de caseinato de sodio, glicerol y carvacrol almacenadas durante 21 días a 25 °C y 50 % HR. Inhibición del crecimiento de a) *S. aureus* y b) *E. coli*.

6.7.2. Caracterización mecánica de las biopelículas durante el almacenamiento

Las propiedades mecánicas a tracción de las biopelículas se estudiaron de acuerdo a la norma ASTM D882-01 [19] a tiempos 7, 14 y 21 días. En la Figura 41 se muestra la deformación en el punto de rotura obtenida para las muestras de caseinato de sodio a los distintos tiempos. Se pudo observar que, incluso tras 21 días de almacenamiento, las biopelículas mostraron propiedades mecánicas satisfactorias, manteniéndose los valores iniciales sin variaciones significativas.

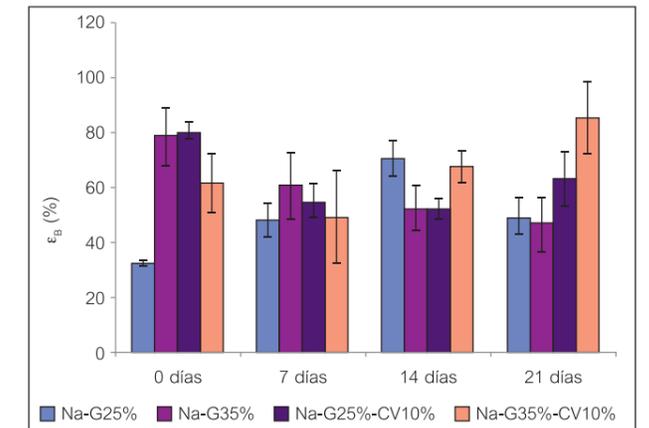


Figura 41. Deformación en el punto de rotura obtenida en las biopelículas de caseinato de sodio (n = 5).

Se observó que el proceso de envejecimiento provocó un aumento en el módulo elástico de Young en las biopelículas de caseinato de sodio (Figura 42). La biopelícula que presentó un mayor aumento en este parámetro fue la de caseinato de sodio con un 25 % de glicerol, que se encontraba menos plastificada y sin la presencia de carvacrol.

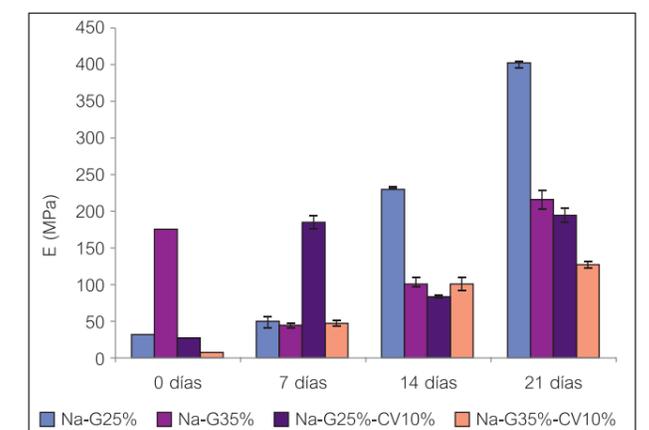


Figura 42. Módulo elástico de Young obtenido para las biopelículas de caseinato de sodio (n = 5).

La deformación en el punto de rotura para las muestras preparadas a partir de caseinato de calcio se muestra en la Figura 43. Estas biopelículas presentaron valores más bajos que las de caseinato de sodio, indicando su mayor rigidez como característica general.

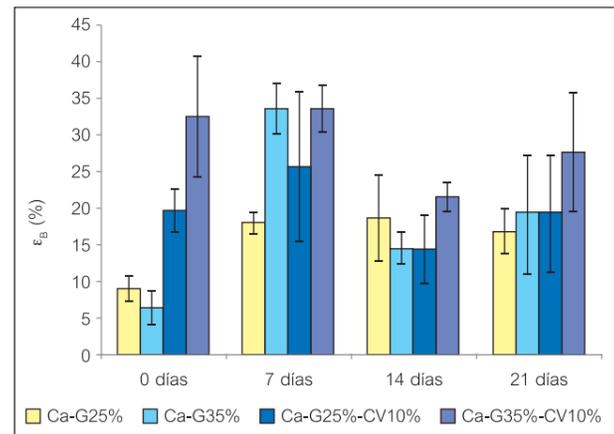


Figura 43. Deformación en el punto de rotura obtenida para las biopelículas de caseinato de calcio ($n = 5$).

En la Figura 44, se muestra el módulo elástico de Young de las biopelículas de caseinato de calcio, las cuales, al igual que las biopelículas de caseinato de sodio, presentaron un aumento en este parámetro a medida que transcurría el envejecimiento.

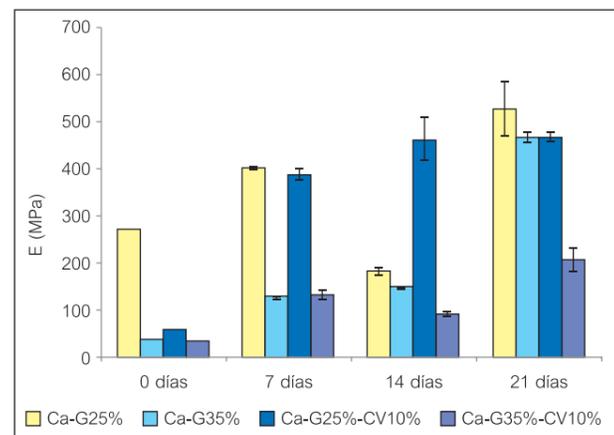


Figura 44. Módulo elástico de Young obtenido para las biopelículas de caseinato de sodio ($n = 5$).

6.8. Estudio de la biodegradabilidad de las biopelículas

A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se evaluó la mejor formulación teniendo en cuenta el compromiso necesario entre las propiedades mecánicas y su acción antimicrobiana. De esta forma, se seleccionó la formulación de caseinato de sodio plastificada con 35 % en peso de glicerol y conteniendo 10 % de carvacrol (NaCas35%GCV10%) y se procedió a estudiar su biodegradabilidad. Para llevar a cabo este estudio se introdujeron las muestras dentro de las mallas de acero inoxidable en los reactores con compost tal como se describió en el apartado 3.10 y se fueron sacando a distintos tiempos de reacción: 10 min, 80 min, 90 min, 120 min, 240 min y 300 min. Tras cada extracción se realizó una inspección visual de las muestras para comprobar el grado de desintegración física en función del tiempo y se tomaron fotografías (Figuras 45-a-f). Al cabo de 90 min, resultó

prácticamente imposible despegar las biopelículas de la malla metálica. Finalmente, tras 300 minutos, las muestras se encontraban totalmente desintegradas bajo las condiciones estudiadas, tanto aquellas sin agente antimicrobiano como las que contenían carvacrol.



Figura 45. a) muestra antes de ser introducida en el reactor; b-f muestras retiradas del reactor a tiempos b) 10 min; c) 80 min; d) 90 min; e) 120 min; f) 240 min.

7. DISCUSIÓN

El análisis FTIR ha demostrado la unión de los caseinatos con el glicerol en la biopelícula a través de fuertes interacciones desarrolladas por la recombinación polielectrolítica de ambos componentes, ya que sus espectros presentaron bandas características de las amidas (en la región 1600-1500 cm^{-1}) comunes en las proteínas; así como también bandas que corresponden a la absorción característica de los alcoholes primarios y secundarios (alrededor de 1030 y 1100 cm^{-1}). Esta conclusión coincide con los resultados aportados por Pereda et. al, (2007) quienes estudiaron también películas de caseinato de sodio plastificadas con glicerol [25].

A partir de la microscopía electrónica de barrido se pudo observar una estructura agrietada en las biopelículas de caseinato de sodio plastificadas con un 25 % en peso de glicerol, lo cual puede ser debido a algún problema en la preparación de las películas. No obstante, Kristo et. al (2008) [26] encontraron que dicha concentración era la mínima necesaria para superar la fragilidad e incrementar la flexibilidad de las películas de caseinato de sodio plastificadas con sorbitol. En la sección transversal de las biopelículas (plastificadas y sin plastificar) se observó la pre-

sencia de pequeñas burbujas que podrían haber sido formadas en la etapa de secado durante la eliminación del agua [26], al crearse vapor en el interior de la matriz y formar una gota, la cual se va desplazando hacia arriba durante el secado de tal modo que va produciendo orificios en las paredes delgadas de la película. Este fenómeno se denomina "balloning" [11].

Del análisis TGA se pudo concluir que la etapa más importante del proceso de degradación global del material es la degradación de los caseinatos, proceso que predomina a temperaturas superiores a 300 °C. La evaporación del plastificante y del agente activo se superponen ligeramente con el inicio de la degradación, siendo complicado separar con claridad el inicio y final de cada proceso mediante esta técnica.

Los valores absolutos de las coordenadas del espacio colorimétrico CIELAB a^* y b^* obtenidos fueron muy cercanos a 0, indicando la ausencia de color y una elevada transparencia para todas las formulaciones; aún para aquellas conteniendo carvacrol. En este sentido, Pereda et. al (2010) [25], si bien obtuvieron películas transparentes de caseinato de sodio plastificadas con glicerol y modificadas con aceite de tung, observaron que presentaban una coloración ligeramente ámbar, con valores para la coordenada b^* de hasta 8,11 cuando este aceite esencial se adicionó en un 10% en peso con respecto a la proteína.

Las biopelículas sin aditivo presentaron valores del módulo elástico de Young comprendidas en el intervalo 0,1-4,2 GPa, mayores que los de algunos polímeros convencionales como polipropileno (0,2-1,2 GPa), polietileno de alta densidad (0,5-1,2 GPa) y politetrafluoretileno (0,3-0,8 GPa) [17]. Este resultado indica una rigidez muy alta de los caseinatos en comparación con las poliolefinas. Por otra parte, las biopelículas de caseinato de calcio resultaron ser más rígidas que las de caseinato de sodio, lo cual coincide con los resultados aportados por Fabra et. al (2010) [27], quienes estudiaron la influencia del calcio en las propiedades mecánicas de biopelículas de caseinato de sodio y calcio. Por otro lado, en el presente estudio el proceso de envejecimiento de las biopelículas de caseinato de sodio, en condiciones de temperatura y humedad relativa controlada, provocó un aumento en el módulo elástico de Young. Sin embargo, este aumento se dio en menor proporción para las películas aditivadas con carvacrol, indicando que éste ejerce una acción importante ayudando a retardar la disminución de la flexibilidad del material debido a su carácter parcialmente plastificante.

En cuanto a las propiedades de barrera al oxígeno, se observó que la adición del agente antimicrobiano produjo un leve aumento en el valor de OTR.e de las biopelículas, disminuyendo ligeramente las propiedades de barrera de éstas. Sin embargo, al ser este incremento poco significativo, las propiedades de barrera al oxígeno se pueden considerar muy adecuadas para su uso como material de envasado activo de alimentos en todos los casos, por ejemplo al contrastar estos resultados con los de otros autores, como los estudiados por Martino et al. (2009) [28] que desarrollaron películas biodegradables para el enva-

sado de alimentos, en base poli(ácido láctico), PLA. Estos autores obtuvieron valores de OTR.e de 29,5 $\text{cm}^3 \text{mm} / \text{m}^2 \text{ día}$, mientras que para PLA plastificado los valores fueron superiores, llegando a ser de 48 $\text{cm}^3 \text{mm} / \text{m}^2 \text{ día}$.

El estudio de la actividad antibacteriana de las biopelículas demostró que todas las formulaciones que contenían carvacrol presentaron dicha actividad tanto frente a la cepa de *S. aureus* como para *E. coli* incluso tras 21 días de almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas. La capacidad antimicrobiana del carvacrol frente a estos microorganismos ha sido ampliamente estudiada. En este sentido, Ben Arfa et. al (2006) [7] demostraron que de los aceites esenciales derivados del orégano, el carvacrol es el que presenta mejores características antimicrobianas frente a *E. coli* y *S. aureus* entre otras bacterias. Por otra parte, el carvacrol ha sido utilizado como agente activo en la formulación de otro tipo de películas; Gutiérrez et al (2009) [29] desarrollaron películas de polipropileno con carvacrol que también inhibieron el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, Lim et al (2010) [30] desarrollaron películas biodegradables en base a algas rojas (*Gelidium corneum*) con carvacrol, presentando capacidad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7. En cuanto a su aplicabilidad al envasado de alimentos, hay que tener en cuenta que, en general, casi todos los alimentos contienen nutrientes suficientes para mantener el crecimiento de la mayoría de los microorganismos [5]. De este modo, al demostrar que las biopelículas aditivadas con carvacrol presentaron actividad antibacteriana durante el almacenamiento, aún después de 21 días, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, se puede concluir que estas biopelículas presentan características antibacterianas satisfactorias para su aplicación en el envasado de alimentos.

Finalmente, las biopelículas desarrolladas en el presente trabajo demostraron una rápida desintegración física, obteniendo tiempos muy inferiores a los indicados en la bibliografía en condiciones de compostaje. Martucci y Ruseckaite, (2009) [23] desarrollaron películas en base gelatina, las cuales fueron sometidas a condiciones de compostaje similares, obteniendo una pérdida de la integridad estructural del material al cabo de 10 días. Lodha y Netravali (2005) [31] estudiaron resinas de aislados proteicos de soja, las sometieron a compostaje que degradaron en 21 días. De este modo, se puede interpretar que la rapidez del proceso de biodegradación obtenido en el presente trabajo es debido a que el compost presenta un elevado porcentaje de humedad. Por lo tanto, es posible que la rápida desintegración de las biopelículas se deba más bien a su hidrólisis en el medio ensayado y no propiamente a la degradación mediada por las bacterias. Este comportamiento de rápida degradación por hidrólisis no es indicativo de que la vida útil del material en un medio no acuoso no sea alta, ya que los polímeros biodegradables se degradan únicamente en condiciones de compostaje y por tanto estas películas podrían ser adecuadas para su uso en contacto con alimentos de bajo contenido acuoso.

8. CONCLUSIONES

1. A partir de los resultados obtenidos y presentados en los apartados anteriores, se puede concluir que la plastificación de biopelículas de caseinatos con glicerol ha sido uno de los factores claves para poder formar las biopelículas dando materiales homogéneos. De esta forma se mejoraron las propiedades dúctiles del material con una reducción en el módulo de elasticidad y un aumento en la elongación en el punto de rotura proporcionales a la concentración de plastificante añadido.
2. Tanto el glicerol como el carvacrol presentaron buena compatibilidad con los caseinatos, formando películas transparentes, sin separación de fases.
3. Todas las formulaciones conteniendo carvacrol inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, demostrando la capacidad antimicrobiana de las biopelículas desarrolladas.
4. Se obtuvieron muy buenas propiedades de barrera al oxígeno, siendo éste un factor muy importante para un envase alimentario a la hora de proteger al alimento contra la oxidación. Además, el valor de este parámetro supone una mejora significativa en relación a otros polímeros biodegradables.
5. Debido a que el material presenta una degradación rápida por hidrólisis, debe estar sometido a condiciones de baja humedad, representando una opción para el envasado de alimentos con bajo contenido acuoso.
6. Todos los compuestos utilizados en las formulaciones son de origen natural y aptos para el consumo. Son altamente biodegradables y por tanto representan una alternativa prometedora y medioambientalmente sostenible a las películas sintéticas que hoy en día se utilizan.
7. Al analizar de forma conjunta las propiedades de las biopelículas de caseinato de sodio y calcio plastificadas con glicerol al 15 %, 25 % y 35 % en peso, sin adición y con un 10% en peso de carvacrol, se puede concluir que la formulación de caseinato de sodio plastificada con un 35 % en peso de glicerol y un 10% en peso de carvacrol (NaCas-G35%-CV10%) es la más adecuada de todas las ensayadas. Esto se debe a que forma una biopelícula de superficie lisa y homogénea, sin separación de fases, con capacidad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*; con buenas propiedades de barrera al oxígeno, alta ductilidad brindando a las biopelículas una flexibilidad aceptable para asegurar la posibilidad de utilización y que se desintegra rápidamente en condiciones de compostaje.
8. Por lo tanto, se puede considerar que el presente trabajo abre una posibilidad en una nueva línea de investigación sobre obtención de sistemas de envasado activo con características antimicrobianas formado por materiales de origen natural, altamente biodegradables y con excelentes propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hernández-Izquierdo VM, Krochta JM. Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation -A Review. *Journal of Food Science* 2008; 73: 30-39.
- [2] Pojanavaraphan T, Magaraphan R, Chiou B-S, Schiraldi DA. Development of Biodegradable Foamlike Materials Based on Casein and Sodium Montmorillonite Clay. *Biomacromolecules* 2010; 11: 2640-2646.
- [3] Audic JL, Chaufer B, Daufin G. Non-food applications of milk components and dairy coproducts: A review. *Lait* 2003; 83: 417-438.
- [4] Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 2006; 39:639-644.
- [5] Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. Microbiología de los alimentos. ACRIBIA S.A. Zaragoza España. I.S.B.N: 84-200-0998-9. 2003.
- [6] Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile, MA. Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology* 2010; 21: 591-598.
- [7] Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Journal compilation. Letters in Applied Microbiology* 2006; 43: 149-154.
- [8] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J.A. Antifungal Activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Food Safety* 2007; 27: 91-101.
- [9] Ponce AG, Roura SI, Del Valle CE, Moreira MR. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology* 2008; 49: 294-300.
- [10] Peltzer M, Wagner J, Jiménez A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2009; 26: 938-946.
- [11] Chalier P, Ben Arfa A, Preziosi-Belloy L, Gontard N. Carvacrol Losses from Soy Protein Coated Papers as a Function of Drying Conditions. *Journal of Applied Polymer Science* 2007; 106: 611-620.
- [12] Sánchez-García MD, Ocio MJ, Giménez E, Lagaron JM. Novel policaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. *Journal of Plastic Film & Sheeting* 2008; 24:239-251.
- [13] Mascheroni E, Chalier P, Gontard N, Gastaldi E. Designing of a wheat gluten/montmorillonite based system as carvacrol carrier: Rheological and structural properties. *Food Hydrocolloids* 2010; 24: 406-413.
- [14] Schou M, Longares, A, Montesinos-Herrero C, Monahan FJ, O'Riordan D, O'Sullivan M.. Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT Food Science Technology* 2005, 38: 605-610.

- [15] Balart-Gimeno R, López-Martínez J, García-Sanoguera D, Parres-García F. Técnicas experimentales de análisis térmico de polímeros. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2003.
- [16] Brown M. Introduction to Thermal Analysis. Chapman and Hall, Nueva York, 1987
- [17] Stuart B. Polymer Analysis. John Wiley and Sons.LTD, London 2002.
- [18] Callister WD. Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. Reverté, Barcelona, 1995.
- [19] ASTM 1993 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM D882-91-01, ASTM Book Stand. 08.01:316. ASTM, Philadelphia, PA.
- [20] Signorini ML, Sequeira GJ, Bonazza JC, Dalla Santina R, Martí LE, Frizzo LS, Rosmini MR. Use of indicator microorganisms for the hygienic-sanitary conditions evaluation in the milk primary production. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia* 2008; 18 (2): 207-217.
- [21] NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; ninth informational supplement document M100-S9, Vol. 19. No. 1, Table 2I. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 1999.
- [22] UNE-EN ISO 20200:2004. Determinación del grado de desintegración de materiales plásticos bajo condiciones de compostaje simuladas en un laboratorio.
- [23] Martucci JF, Ruseckaite RA. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability* 2009; 94: 1307-1313.

- [24] Pereda M, Aranguren MI, Marcovich NE. Characterization of Chitosan/Caseinate Films. *Journal of Applied Polymer Science* 2008; 107:1080-1090.
- [25] Pereda M, Aranguren MI, Marcovich NE. Caseinate films modified with tungoil. *Food Hydrocolloids* 2010; 24: 800-808.
- [26] Kristo E, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids* 2008; 22: 373-386.
- [27] Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering* 2010; 96: 356-364.
- [28] Martino VP, Ruseckaite RA, Jiménez A. Processing and characterization of poly(lactic acid) films plasticized with commercial adipates. *Journal of Applied Polymer Science* 2009; 112: 2010-2018.
- [29] Gutiérrez L, Escudero A, Batlle R, Nerín C. Effect of Mixed Antimicrobial Agents and Flavors in Active Packaging Films. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 8564-8571.
- [30] Lim GO, Hong YH, Song KB. Application of Gelidium corneum Edible Films Containing Carvacrol for Ham Packages. *Journal of Food Science* 2010; 75, (1): 90-93.
- [31] Lodha P, Netravali AN. Effect of soy protein isolate resin modifications on their biodegradation in a compost medium. *Polymer Degradation and Stability* 2005; 87: 465-477.

Agradecimientos

A la FUNDACION MAPFRE, específicamente al Programa de Becas Ignacio Hernando de Larramendi 2009 para la prevención y medio ambiente, por conceder la beca que ha financiado el presente trabajo.

A FERRER ALIMENTACION S.A. por proporcionar las materias primas (caseinatos).

Al departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante donde se ha realizado el presente trabajo.