







***UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA***  
***FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS***

Centro de Química Aplicada

**Desarrollo de envases flexibles bioactivos para  
alimentos**

**Tesis de Maestría en Ciencias Químicas**

***Charles Germán***

**2014**



*El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Química  
Aplicada (CEQUIMAP), de la Facultad de Ciencias Químicas.  
Universidad Nacional de Córdoba*

**Director:**

*Dr. Pablo G. Manzo*

**Co-Director:**

*Dra. Miriam C. Strumia*

**Comisión de Tesis:**

*Dr. Daniel A. Allemandi*

*Dra. Miriam C. Strumia*

**Evaluador externo:**

*Dra. Adriana N. Mauri*



## **Agradecimientos**

*Le quiero agradecer a mi director, Pablo Manzo, por la confianza y dedicación que tuvo conmigo para llevar adelante este trabajo y del cual aprendí muchas cosas.*

*A Miriam Strumia, quien también confió desde un inicio en mí, para este proyecto y esta Tesis de maestría.*

*Le quiero agradecer y dedicar con mucho aprecio y cariño a Ricardo Toselli, quien colaboró conmigo en tantas oportunidades y me expresó su apoyo en cada una de las etapas de este trabajo y de mi formación.*

*Al Centro de Química Aplicada, por brindarme el lugar y parte de los recursos necesarios para finalizar esta Tesis.*

*A la Universidad Nacional de Córdoba y a la Facultad de Ciencias Químicas.*

*A Mariana Nuñez, quien sin su apoyo y calidez humana, hubiese sido imposible conseguir la finalización de este trabajo.*

*A Marisa Martinelli, por su apoyo, ayuda y franqueza..*

*A Dagna “El demonio”, por su apoyo y cariño incondicional.*

*A mis amigos Ezequiel, Ariel y Pablo, por su maravillosa compañía en estos años.*

*A mis amigos Manu, Guguilo, Germán y Cabe quienes admiro muchísimo como amigos y profesionales.*

*A la gente que constituye y que pasó por CEQUIMAP, un lugar muy valioso para mí.*

*Al grupo de POLIMEROS del departamento de Orgánica, quienes me recibieron como un integrante más y a quienes aprecio mucho.*

*Al área de Microbiología de CEQUIMAP (Gera, Martin y Ceci) por su ayuda en numerosas etapas de la Tesis.*

*A mis padres y hermanos a quienes quiero mucho y son un ejemplo para mí.*

*A mis hermanos de la vida... de mi estilo de vida.*

*Gracias ...*





## **Resumen**

*En este trabajo de Tesis, se propuso desarrollar una tecnología para la fabricación de “envases bioactivos”. Este desarrollo tecnológico, se vio impulsado por la necesidad de la industria alimenticia local, de ofrecer nuevas alternativas de conservación que impliquen el uso de materiales activos, capaces de extender el tiempo de aptitud de los alimentos envasados.*

*La generación de las películas activas se llevó a cabo mediante la incorporación de natamicina (poderoso agente antifúngico empleado en la industria alimenticia) a la superficie de películas de polipropileno biorientado. En primera instancia fue necesaria la modificación superficial del polímero, a los fines de conseguir la presencia de grupos funcionales específicos que posibiliten la unión del agente antifúngico. Dicha funcionalización se llevó a cabo mediante el injerto de ácido acrílico sobre la superficie de las películas de polipropileno. Para esto, se evaluó el uso del tratamiento plasma, descarga corona y radiación ultravioleta (fotoinjerto) como fuentes de energía de las reacciones de modificación; siendo la radiación ultravioleta, la seleccionada en este trabajo para llevar adelante el injerto en las películas.*

*La incorporación de natamicina a la superficie de las películas de polipropileno, se realizó utilizando diferentes estrategias de inmovilización del antifúngico: i) a través de su inmovilización física a superficies previamente injertadas con ácido acrílico, ii) mediante su unión covalente a películas previamente injertadas con el mismo monómero y iii) llevando a cabo el recubrimiento o “coating” de las películas sin modificar, con una resina acrílica conteniendo al compuesto activo.*

*Diferentes ensayos microbiológicos realizados en medios de cultivo, demostraron que aquellas películas con el agente activo inmovilizado físicamente y aquellas recubiertas con la resina acrílica conteniendo al mismo, fueron capaces de inhibir completamente el desarrollo de mohos y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*) sobre la superficie del agar, en tanto que las películas con natamicina inmovilizada covalentemente, no presentaron esta propiedad.*

*La evaluación final de las películas bioactivas, con respecto a sus propiedades antifúngicas, fue llevada a cabo sobre la superficie de una matriz alimenticia real (particularmente queso fresco), por un periodo de 21 días a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos, demostraron que las películas injertadas y con natamicina inmovilizada físicamente, fueron capaces de inhibir más del 96% la carga de mohos y levaduras presentes en la superficie del alimento. Por su parte, las películas con recubrimiento antimicrobiano fueron capaces de inhibir aproximadamente un 90% el crecimiento de levaduras sobre la superficie del queso en contacto.*

*La eficiencia antifúngica de las películas bioactivas inmovilizadas físicamente, también fue comparada con el efecto inhibitorio generado por la aplicación directa de natamicina sobre la superficie del queso. Al respecto, los resultados obtenidos mostraron que el poder inhibitorio de las películas activas, en comparación a la aplicación directa del conservante, fue superior. También se realizaron ensayos según métodos oficiales, que permitieron determinar que la cantidad de natamicina residual en el queso, luego de estar éste en contacto con las películas activas, fue un orden de magnitud menor que el límite permitido por la legislación vigente.*

*Esta innovación, resultado del trabajo de Tesis, es muy importante por el impacto directo en la calidad de vida de los consumidores, ya que no solo aspira a mantener la calidad de los alimentos envasados a lo largo del periodo de distribución, comercialización y almacenamiento, sino que también pretende evitar que los consumidores ingieran sustancias químicas que no tienen una finalidad nutricional y que solo son utilizadas a los fines de extender la vida útil del producto.*

## Abreviaturas

**%G** Porcentaje de injerto o porcentaje de *grafting*

**%T** Porcentaje de transmitancia

**[BOPP- *g*-AA]- NAT** Polipropileno biorientado injertado con ácido acrílico y natamicina unida covalentemente.

**AA** Acido acrílico

**Abs** Absorbancia

**Ac** Ácido Acético

**a<sub>w</sub>** Actividad de agua

**ATR** Reflectancia Total Atenuada

**BF** Benzofenona

**BF•** Radical benzopinacol

**BOPP** Polipropileno Biorientado

**BOPP- *g*-AA** Copolímero de injerto de AA en polipropileno biorientado

**BOPP- *g*-AA + NAT** Polipropileno biorientado injertado con ácido acrílico y natamicina inmovilizada físicamente.

**BOPP/RA** Película de polipropileno biorientado con recubrimiento o "*coating*" de resina acrílica.

**BOPP/RA:NAT** Película de polipropileno biorientado con *coating* antimicrobiano a base de natamicina.

**cm** Centímetro

<b>DCC</b>	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>FT IR</b>	Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier
<b>M</b>	Molar (mol/L)
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>min</b>	Minutos
<b>NAT</b>	natamicina
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PE</b>	Polietileno
<b>PEBD</b>	Polietileno de baja densidad
<b>PET</b>	Polietilen tereftalato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PVC</b>	Policloruro de vinilo
<b>RA</b>	Resina acrílica de polimetacrilato de metilo
<b>seg</b>	Segundos
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WCA</b>	Angulo de contacto de gota de agua

## Contenido

Capítulo 1: Introducción .....	1
1.1 Envases plásticos en general .....	3
1.2 Envases Activos .....	4
1.2.1 Formatos de envases activos .....	7
1.3 Envases antimicrobianos .....	9
1.3.1 Formatos de envases antimicrobianos .....	10
1.4 Aspectos legales y de comercialización de los envases activos .....	13
1.5 Desarrollo de envase antimicrobiano para alimentos.....	14
A) Modificación superficial del material polimérico .....	15
B) Incorporación del agente antimicrobiano (Bio-funcionalización) .....	22
C) Evaluación de la efectividad antimicrobiana de los materiales.....	27
1.6 Importancia y antecedentes que impulsan el presente trabajo .....	30
1.7 Objetivos planteados para el desarrollo del presente trabajo de Tesis.....	31
Capítulo 2: Desarrollo experimental .....	32
2.1 Materiales .....	34
2.2 Equipos.....	34
2.3 Procedimientos .....	35
2.3.1 Modificación superficial de películas de BOPP .....	35
2.3.2 Caracterización de las superficies modificadas superficialmente .....	40
2.3.3 Incorporación del agente antifúngico NAT. ....	42
2.3.4. Determinación de NAT en películas activas.....	43
2.3.5. Migración de NAT en agua. Liberación del agente antifúngico de películas BOPP-g-AA + NAT y BOPP/RA + NAT en agua. ....	45
2.3.6. Pruebas microbiológicas .....	45
2.3.7. Determinación del contenido de NAT en superficie de queso: ISO 9233-1:2007 (IDF 140-2: 2007).....	49
Capítulo 3: Resultados y discusión .....	51

3.1 Modificación superficial de materiales poliméricos: Injerto de AA en películas comerciales de BOPP. ....	53
3.1.1 Injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante previa activación a través de tratamiento plasma o descarga corona .....	55
3.1.2 Injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante reacción asistida por radiación UV: reacción de fotoinjerto.....	61
3.1.3 Conclusiones parciales .....	73
3.2 Incorporación del agente antifúngico (NAT) en películas de BOPP.....	75
3.2.1. Inmovilización física de NAT en superficies de BOPP- <i>g</i> -AA. ....	77
3.2.2 Inmovilización covalente de NAT en superficies de BOPP- <i>g</i> -AA.....	86
3.2.3 Recubrimiento antimicrobiano de superficies de BOPP comercial. ....	89
3.2.4 Conclusiones parciales. ....	92
3.3 Evaluación de la eficiencia de las películas modificadas .....	95
3.3.1 Análisis de la carga microbiana en la matriz alimenticia. ....	97
3.3.2 Prueba de la efectividad antimicrobiana de películas de BOPP- <i>g</i> -AA+ NAT en matrices reales de queso fresco.....	100
3.3.3. Valoración de los resultados obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas.....	112
3.3.4 Prueba de la efectividad antimicrobiana de películas con recubrimiento activo, BOPP/RA + NAT. ....	113
3.3.5 Conclusiones parciales .....	117
Capítulo 4: Conclusiones generales.....	119
4.1 Conclusiones generales.....	121
Capítulo 5: Bibliografía .....	126
5.1 Bibliografía .....	128

# Capítulo 1: Introducción

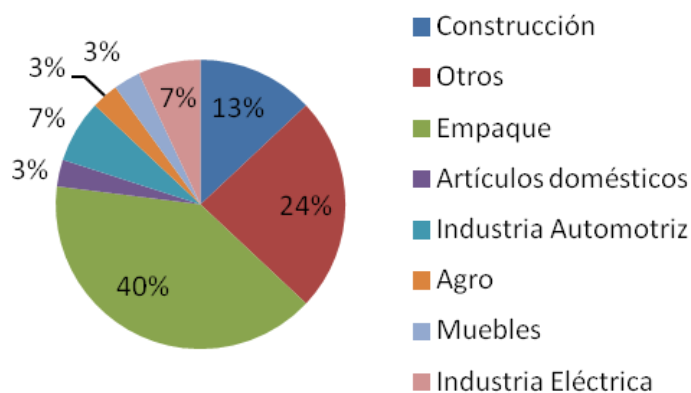




## 1.1 Envases plásticos en general

En la actualidad, muchos de los objetos con los que tenemos contacto, están hechos total o parcialmente de algún tipo de polímero. La popularidad de estos materiales, se debe a la variedad de propiedades casi ilimitada que se les puede dar: los hay duros, blandos, rígidos, flexibles, densos, ligeros, transparentes, opacos, pegajosos, antiadherentes, impermeables, absorbentes, conductores, aislantes, etc. La enorme versatilidad de los materiales poliméricos, se ve reflejada en el amplio espectro de aplicaciones de las cuales son protagonistas.

En la Figura 1.1.1, se puede observar la distribución de cada uno de los destinos con los que son producidos los materiales plásticos en el territorio argentino (Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires 2010):



**Figura 1.1.1.** Destino de los plásticos elaborados en Argentina.

En nuestro país, al igual que en el resto de mundo, la mayor parte del plástico producido tiene como destino final la manufactura de envases y embalajes en general. De esta fracción, el 47% es utilizado solo como envases para alimentos (González 2013).

El hecho que mayoritariamente los envases y embalajes estén constituidos por plásticos, no es fortuito, sino que tiene sus fundamentos en numerosas ventajas que estos materiales ofrecen:

- Son químicamente inertes en contacto con la mayoría de los productos alimenticios.
- Son livianos comparados con otros materiales con que también se fabrican envases, lo cual facilita su transporte y manipulación.

- Pueden ser moldeados a temperaturas relativamente bajas en comparación a otros materiales, lo que significa un importante ahorro energético.
- Requieren generalmente de poca materia prima para su elaboración.
- En su mayoría son reciclables.
- Ofrecen buena resistencia a las roturas.
- Son higiénicos y económicos.
- Se caracterizan por ser extremadamente versátiles, ya que se pueden encontrar en forma de películas delgadas o de gran espesor, opacos, brillantes, traslúcidos, etc.
- Las propiedades de barrera a gases y al vapor de agua, pueden ser modificadas en función de la composición del material y la incorporación de aditivos.

En la actualidad se dispone de una amplia gama de envases y embalajes de muy diversos compuestos y características, que intentan satisfacer la demanda de la gran cantidad de productos alimentarios que existen en el mercado. Debido a esta variabilidad de productos, no es posible el uso de un envase ideal que sea válido para todos los alimentos por igual. Por lo tanto es necesario seleccionar para cada uso, el envase y la tecnología de envasado más adecuada en función de distintos parámetros.

Los envases juegan un papel fundamental en la conservación, distribución y comercialización de los alimentos, las funciones asignadas tradicionalmente al envase son las de contener, proteger, informar y atraer; sin embargo, estas han ido cambiando a lo largo de los años, como respuesta a las profundas transformaciones en la forma de comercialización y estilo de vida de los consumidores. Este escenario dinámico, ha forzado el advenimiento de una forma novedosa de envasado y conservación, los “envases activos”.

## **1.2 Envases Activos**

De acuerdo a un reporte del año 2011 de la FDA, en el mundo cada año son desechados 1.3 billones de toneladas de alimentos, de los cuales un gran porcentaje se debe a inconvenientes asociados a fases de producción, distribución y almacenamiento.

En América Latina, esta pérdida es de aproximadamente 200 kg por individuo en solo un año, en tanto que en países más desarrollados alcanza los 300 kg/año (Dobrucka 2013; Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente 2013); en este contexto, los envases juegan un papel fundamental.

Los alimentos no son productos inalterables que conserven indefinidamente sus características físicas, químicas y microbiológicas. De hecho, los alimentos se deterioran con el paso del tiempo, ya sea por la acción de organismos vivos, por la acción físico-química del entorno o por la actividad biológica del propio alimento (Costamagna 2006).

El envasado tradicional o “pasivo” de los alimentos, tienen como principal objetivo resguardar y proteger a los productos de la acción de agentes externos, como ser microorganismos, oxígeno, olores, luz, etc. y de esta manera garantizar la conservación de la calidad de un alimento por un determinado periodo de almacenamiento. Para lograr esto se intenta que los envases tradicionales, al estar en contacto con los alimentos, sean inertes y no tengan ningún tipo de interacción físico-química con el producto (Dainelli et al. 2008).

En las últimas décadas, uno de los desarrollos más innovadores en el área del envasado de alimentos, es el concepto de “envase activo”. Junto con las técnicas de envasado en atmósfera controlada (CAP) y modificada (MAP), estas tecnologías han ganado terreno en el mercado global, destacándose en países como Japón y Estados Unidos (Restuccia et al. 2010). A diferencia de los envases tradicionales, en los sistemas activos de envasado, se busca deliberadamente una interacción entre el material y el alimento, o su entorno. El propósito de este tipo de tecnología es extender el tiempo de vida útil del alimento y asegurar su calidad en este periodo. Estas dos características, constituyen la principal diferencia entre los sistemas activos y otra novedosa tecnología de almacenamiento, que también se basa en la interacción con el alimento: los envases “inteligentes”. Estos últimos, intentan “monitorear” la condición de almacenamiento del producto y brindar información acerca de su calidad, pero no de conservarla.

*“Los materiales o artículos activos para alimentos, son definidos como materiales o artículos que están destinados a extender o mantener el tiempo de vida útil del producto*

*alimenticio envasado. Poseen incorporados compuestos que pueden liberar o absorber sustancias dirigidas o provenientes del alimento o su entorno. Estos materiales, pueden generar cambios en la composición y/o características organolépticas de los alimentos a condición de que estos cambios cumplan con las disposiciones previstas en las legislaciones correspondientes” (Framework Regulation on Food Contact Materials- 1935/2004).*

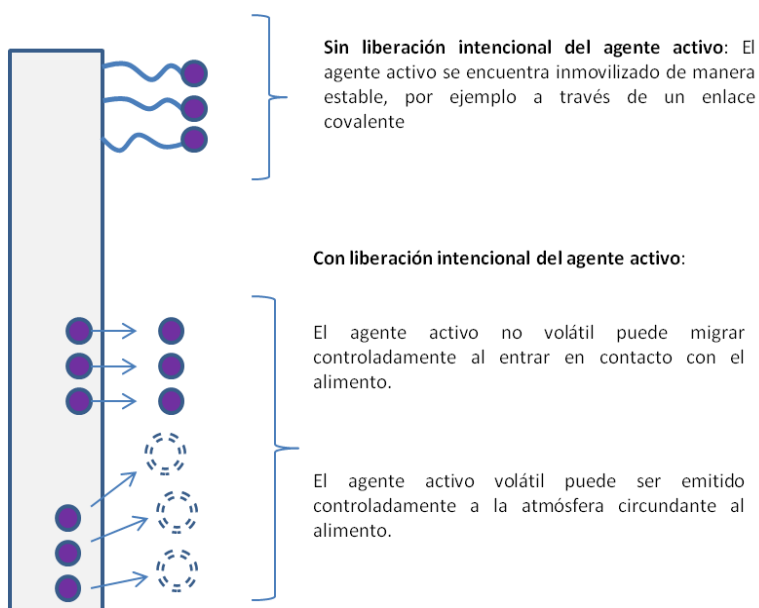
Paradójicamente, si bien la tecnología de los envases activos es considerada “novedosa” o “moderna”, el concepto en sí mismo se remonta a épocas ancestrales donde diferentes culturas de Asia, África y Sud América, empleaban numerosas variedades de vegetales para recubrir alimentos con la finalidad de contenerlos y protegerlos, pero además, por su habilidad de estos vegetales para transferir al producto diferentes características y propiedades, como ser sabores, aromas, color, enzimas y hasta sustancias antimicrobianas (Dainelli et al. 2008).

Es a partir de los años ochenta, cuando la idea de envasado activo comienza a desarrollarse y se materializa en la comercialización de países como Japón y Australia. Luego irá ganando terreno no solo en la industria alimenticia, sino también en la farmacéutica, informática, textil, entre otras. La novedad que conlleva esta técnica, resulta en aprovechar los cambios que ocurren durante la “vida” del producto envasado, convirtiéndolos en aspectos positivos que colaboren a la preservación de su calidad. Esto significa superar la barrera de lo inercial asociada a los envases tradicionales y avanzar a la búsqueda de interacciones que sean convenientes entre el material y el alimento. En este sentido, surgen numerosas ventajas del uso de los envases activos: aumento del tiempo de vida útil de los alimentos, reducción del empleo de aditivos o conservantes, reducción de costos debidos a la utilización de técnicas de conservación alternativas (por ejemplo, técnicas de envasado en atmósfera controlada), entre otras (Costamagna 2006).

Los envases activos generalmente son diseñados para atender algún requerimiento o propiedad específica de los alimentos. Esta propiedad o requerimiento seleccionado, normalmente es la más crítica en cuanto al deterioro de su calidad o tiempo de vida útil. Esto obliga, al igual que en las tecnologías tradicionales de envasado, a realizar un estudio y un diseño en concordancia con las exigencias propias del alimento (Han 2005).

## 1.2.1 Formatos de envases activos

La elección de la forma o diseño de un envase activo, está basada en tres consideraciones globales: primero, los requerimientos del alimento; segundo el formato del envase que estará en contacto el alimento y por último, los requerimientos del agente activo (Han 2005). Pueden ser clasificados en dos grupos principales: i) aquellos en los cuales no hay liberación de compuestos activos y ii) aquellos en donde intencionalmente hay una migración o liberación controlada de sustancias volátiles o no volátiles activas al alimento o su entorno (Figura 1.2.1).



**Figura 1.2.1.** Clasificación de envases activos: i) Sin liberación del agente activo o ii) Con migración o liberación del agente activo.

Los sistemas de envasado activo más comunes son:

- **Sistemas Absorbentes de humedad:** Comúnmente constituidos por polímeros superabsorbentes, zeolita, celulosa u otros. Por lo general, estos compuestos se encuentran en el entorno del alimento, dentro de un envase secundario permeable y sin tener contacto directo con la matriz alimenticia. Como su nombre lo indica, son capaces de reducir la cantidad de agua en fase vapor, producto del exudado de los alimentos y que

puede favorecer el crecimiento microbiano. Por lo general son utilizados en alimentos con elevada actividad de agua ( $a_w$ ), por ejemplo frutas, vegetales, pescados, carnes. También en aquellos alimentos que pierden aceptación en caso de encontrarse húmedos, como ser “snaks”, cereales, comidas secas, maní, etc.

- *Sistemas absorbentes de etileno*: El funcionamiento de estos dispositivos está basado en una serie de reacciones capaces de consumir el etileno presente en la atmósfera circundante a algunos alimentos. Son extremadamente útiles en productos de exportación, ya que disminuyen la velocidad de maduración producida por la presencia de la molécula de etileno, ya que ésta es una fitohormona. En la presentación comercial, pueden encontrarse como elementos independientes o integrados en el envase. Su mayor utilización es en frutos climatéricos (Vermeiren et al. 1999).
- *Sistemas absorbentes de oxígeno*: Las reacciones de oxidación con sustancias presentes en los alimentos tienen como consecuencia aromas indeseables, cambios de color de la superficie por pardeamiento, pérdida de nutrientes, etc. Además, la presencia de oxígeno puede favorecer en ciertos casos el desarrollo de microorganismos aerobios como ser *Pseudomonas*. Para disminuir la presencia de oxígeno, la mayoría de estos sistemas comerciales están basados en la oxidación de sales de hierro, aunque también los hay de ácido ascórbico y catecol. Las sustancias absorbentes son colocadas en reservorios secundarios o incluidas en la formulación del envase primario y suelen tener resultados más efectivos que las técnicas de envasado en atmósfera modificada (MAP). Se los puede encontrar en pan, galletas, pizza, café, jugos, entre otros (Coma 2008).
- *Sistemas reguladores de CO<sub>2</sub>*: Los envases activos de emisión de CO<sub>2</sub> son utilizados debido a la actividad antimicrobiana de este compuesto frente a una amplia gama de microorganismos aerobios y fúngicos. Tales sistemas están basados en carbonato ferroso o una mezcla de ácido ascórbico y bicarbonato de sodio. Por otra parte, elevadas concentraciones del gas son indeseables ya que pueden resultar tóxicas, por lo que necesitan ser removido del entorno del alimento. Para esto se suelen incorporar al envase, agregados cuyos principios activos son hidróxido de calcio o carbón activado.

- *Sistemas de envasado antimicrobiano:* La contaminación microbiológica de los alimentos y el posterior crecimiento de microorganismos, es su principal causa de deterioro: disminuye el tiempo de vida útil y compromete la seguridad alimentaria de los mismos. Los métodos tradicionales para inhibir el crecimiento microbiano incluyen tratamientos térmicos, frizado, radiación, pre-cocción, atmósferas controladas y también, la adición directa de agentes antimicrobianos, que en ocasiones pueden generar una gran variedad de inconvenientes. Desafortunadamente, estas técnicas de conservación no pueden aplicarse a todos los alimentos por igual.

### **1.3 Envases antimicrobianos**

La tecnología de los envases antimicrobianos es una forma prometedora de envase activo, cuyo objetivo principal es aumentar el tiempo de vida de los alimentos envasados, evitando el deterioro de los mismos por el accionar de los microorganismos. El diseño o modelo de los envases antimicrobianos puede variar significativamente dependiendo del uso al cual estén destinados, es por ello que a la hora de llevar a cabo su desarrollo, los siguientes factores deben ser tenidos en cuenta (Han 2000):

*Naturaleza química del envase, los procesos asociados a su producción y la actividad antimicrobiana residual luego del procesamiento:* La elección del agente antimicrobiano, por lo general depende de sus limitaciones frente a diferentes condiciones relacionadas al procesamiento del envase (extrusado, laminado, impresión, etc.) y de su compatibilidad con el material (diferencia de polaridad, solubilidad, etc.). Un ejemplo particular, sería la necesidad de realizar a bajas temperaturas el extrusado de polietileno de baja densidad (PEBD) aditivado con sorbato de potasio, debido a que la actividad de este conservante, puede verse resentida a temperaturas elevadas (Han & Floros 1997). Conocer la actividad antimicrobiana luego del procesamiento del envase, es un factor fundamental para la elección del agente antimicrobiano y por lo tanto en el diseño del envase activo.

*Características de las sustancias antimicrobianas y de los alimentos:* Los componentes de los alimentos pueden afectar significativamente la actividad de las

sustancias antimicrobianas. Las características físico-químicas de los alimentos pueden tener consecuencias directas en su actividad, por ejemplo el pH de un alimento puede influenciar en la ionización del sitio activo del agente antimicrobiano y alterar radicalmente la actividad biológica. Otro factor que puede modificar sustancialmente la actividad y la estabilidad química de un agente activo, es la  $a_w$  del producto envasado. También, cada alimento posee una microflora particular, la cual debe ser tenida en cuenta a la hora de seleccionar e incorporar el agente antimicrobiano (Quintavalla and Vicini 2002).

*Temperatura de almacenamiento:* La temperatura a la cual son conservados los alimentos puede tener efectos en la actividad del antimicrobiano, además de modificar el grado de transferencia de éste hacia el alimento. Por lo general, al aumentar la temperatura de almacenamiento, la migración del agente activo suele incrementarse. La temperatura también puede incidir en la actividad antimicrobiana residual del compuesto, por lo que es de suma importancia conocer las condiciones de almacenamiento de un determinado producto, para poder predecir la eficiencia de los compuestos activos utilizados.

*Propiedades físicas de los materiales constituyentes del envase:* Las prestaciones y las características de los materiales del envase, deben mantenerse luego de la adición o incorporación de las sustancias activas. Esto es quizás uno de los desafíos más importantes en el diseño de envases antimicrobianos.

### **1.3.1 Formatos de envases antimicrobianos**

Los sistemas de envasados para contener y proteger alimentos, normalmente están conformados por el producto, el envase y el espacio existente entre ambos. Particularmente en los envases antimicrobianos, el agente activo puede ser incorporado en partes no comestibles del envasado como ser películas, bicapas, recubrimientos o en el espacio entre el material y el producto, a través de *sachets* o almohadillas. Los recubrimientos comestibles, por otra parte, también son una forma de envases antimicrobianos que últimamente han sido desarrollados para prevenir el deterioro principalmente de frutas (Han 2005).



Algunos de los formatos más comunes de envases antimicrobianos, de los cuales varios están disponibles comercialmente, son:

- *Envases con adición del agente activo en reservorios secundarios o “sachet”.*

En estos casos son utilizados sustancias volátiles capaces de inhibir el crecimiento microbiano, mediante su liberación al entorno del alimento. Los compuestos más utilizados comercialmente son CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y vapores de etanol. Como se mencionó anteriormente, los sistemas absorbentes de oxígeno, indirectamente también cumplen una función inhibitoria frente a microorganismos aerobios.

- *Sistemas con el agente dispersado en el material del envase.*

Una alternativa al uso de “sachets” conteniendo el agente activo, es incluir a este, directamente en el material polimérico del envase. En estos sistemas, el compuesto antimicrobiano (bactericidas, enzimas, quelantes, iones metálicos, ácidos orgánicos, entre otros) es adicionado al polímero durante el proceso de extrusado y producción de las películas plásticas. Una desventaja, es que debido a las condiciones empleadas en dichos procesos (elevadas temperaturas, compresión, etc.), se puede ver disminuida la actividad antimicrobiana de los agentes activos incorporados.

- *Sistemas constituidos por macromoléculas antimicrobianas.*

Macromoléculas que exhiben actividad antifúngica o antibacteriana, son excelentes candidatos para la elaboración de sistemas antimicrobianos que son utilizados en numerosas áreas de investigación y sectores de la industria. Uno de los ejemplos más comunes es el quitosán, este es un polímero natural con comprobada actividad antimicrobiana, con el cual se han elaborado películas y recubrimientos para alimentos con el propósito de evitar su deterioro por acción de levaduras, bacterias Gram negativas y particularmente Gram positivas (Coma 2008; Helander et al. 2001; Muñoz-Bonilla and Fernández-García 2012).

- *Recubrimientos activos comestibles.*

Esta clase de envases antimicrobianos ha recibido especial atención en los últimos años, debido a factores ambientales y a la necesidad de nuevas técnicas de almacenamiento. Los recubrimientos y películas a base de polisacáridos, proteínas y lípidos, tienen una serie de ventajas como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, buena apariencia y propiedades de barrera frente a oxígeno y estrés físico (González 2013).

- *Materiales con nanopartículas antimicrobianas.*

Últimamente ha habido un enorme interés por este tipo de envases activos, que emplean como agentes antimicrobianos a nanotubos de carbón o nanopartículas metálicas. Los nanomateriales de Plata, Oro y Zinc poseen comprobada actividad antimicrobiana y son los más utilizados en este tipo de materiales; en especial los de plata son encontrados en numerosas aplicaciones comerciales, dado a su gran estabilidad y eficiencia frente a aproximadamente 150 especies diferentes de bacterias (Kumar and Münstedt 2005). Estos sistemas, actúan a través del contacto directo con el producto o mediante su migración lenta y posterior acción (Silvestre, Duraccio, and Cimmino 2011).

- *Sistemas con el agente activo inmovilizado en la superficie del material.*

Este tipo de inmovilización de los agentes activos, se presenta como una alternativa a su incorporación en el momento de extrusado del polímero o *casting*. Permite incluir en superficies plásticas aquellos antimicrobianos que no son capaces de soportar las condiciones mecánicas y de temperatura típicas del proceso de extrusado, o que puedan sufrir alteraciones debido a la presencia de determinados solventes en la formación por *casting* de las películas (Appendini and Hotchkiss 2002a). Esta forma de incorporar al agente activo, tiene la ventaja de disminuir la cantidad adicionada del compuesto a la matriz del polímero, minimizar la pérdida de actividad antimicrobiana y ayudar a mantener la concentración del compuesto en la superficie del alimento, en niveles adecuados que aseguren su efecto inhibitorio.

## **1.4 Aspectos legales y de comercialización de los envases activos**

En comparación a los sistemas tradicionales de envasado, la deliberada interacción que existe entre los envases activos, el alimento y su entorno, ha generado un cambio radical en la forma de evaluar la seguridad y el uso de estas nuevas tecnologías. En estos casos, el riesgo que representa la migración de sustancias desde el envase hacia el alimento o el uso inadecuado de estos dispositivos, ha motivado la necesidad de incluir disposiciones al marco regulatorio, acerca de la seguridad y el rotulado de envases activos.

En este sentido, la normativa 1935/2004 de la Unión Europea (UE), fue la responsable de agrupar todos los requisitos básicos establecidos para materiales en contacto con alimentos, incluidos envases activos e inteligentes. Finalmente, la norma 450/2009 sancionada luego fue incluida a la anterior, para integrar aspectos específicos para la comercialización y el mercado de los envases activos e inteligentes. En ella, se destacan los requisitos necesarios para la introducción de los envases activos en el mercado (Artículo 4), las sustancias permitidas para ser utilizadas tanto en envases activos como inteligentes (Artículos 5 al 8), las disposiciones acerca del etiquetado específico de partes no comestibles incluidas en estos envases (Artículo 11), requisitos de documentación (Artículo 13), entre otras (Restuccia et al. 2010).

En nuestro país, la reglamentación vinculada al uso de envases o artículos en contacto con alimentos, ha sido heredada del marco legislativo del MERCOSUR e incorporada en el Código Alimentario Argentino (C.A.A). Esta legislación es similar a la vigente en la UE, principalmente en lo que respecta a límites de migración global, migración específica y listas positivas de materiales en contacto con alimentos (Kopper and Ariosti 2010). Sin embargo, las especificaciones que se encuentran en el Reglamento (CE) 450/2009, correspondientes a materiales activos e inteligentes, no forman parte de la normativa nacional. Desafortunadamente, esta disparidad entre la legislación local vigente y el avance acelerado de nuevos conocimientos e innovaciones en el área, genera un retraso en la inserción de materiales de envasado activo en el mercado local.

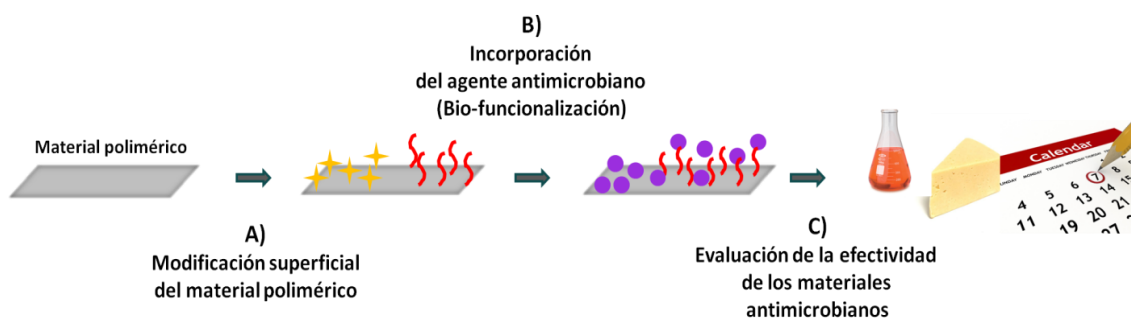
Además de la poca flexibilidad en las legislaciones actuales, otro aspecto a sortear es el rechazo de los distintos grupos de consumidores, por ejemplo a las tecnologías de

envases activos que involucran la migración de diferentes sustancias, como ser aromatizantes, saborizantes o agentes antimicrobianos. La aceptación de los consumidores al uso de nuevos envases activos en general, está mayoritariamente relacionada a la comodidad y facilidad con que pueden ser utilizados estos sistemas, que no impliquen cambios en su cultura alimenticia o estilo de vida y que además no incremente el costo del producto

El reconocimiento de los beneficios de las tecnologías de envasado activo por parte de las legislaciones y la industria alimenticia, el desarrollo de sistemas de envasado económicamente viables y una mayor aceptación de los consumidores, abre nuevas fronteras para la tecnología de envases activos.

### 1.5 Desarrollo de envase antimicrobiano para alimentos.

Dentro los formatos más comunes de envases antimicrobianos (1.3.1), el de especial interés en este trabajo, es aquel en que el agente activo se encuentra inmovilizado en la superficie del material. En general se pueden distinguir tres etapas fundamentales en el proceso de obtención de este tipo de materiales antimicrobianos para alimentos: **A)** La modificación superficial de la matriz polimérica seleccionada, **B)** La incorporación del agente antimicrobiano y **C)** La evaluación de la efectividad antimicrobiana de los materiales obtenidos (Figura 1.5.1).



**Figura 1.5.1.** Etapas en la obtención de los materiales antimicrobianos.

La naturaleza inerte de la mayoría de los materiales seleccionados para la inmovilización de compuestos activos, hace que en un primer paso sea necesaria su funcionalización superficial. En este punto, es de vital importancia optimizar las técnicas de modificación superficial y lograr introducir el número y el tipo de grupos funcionales deseado; esto determinará la cantidad de compuesto activo por unidad de área. Una de las maneras más eficientes de conseguir este propósito, es a través del injerto o “*grafting*” de las superficies poliméricas (**A**).

En un segundo paso se lleva a cabo la unión del compuesto activo al sustrato sólido, mediante su interacción con los grupos funcionales presentes en la nueva arquitectura de la superficie (**B**). Por lo general, se intenta que esta unión sea mediada por “espaciadores” que reduzcan los impedimentos estéricos y alejen a la molécula activa de la superficie hidrofóbica y prevenir su desnaturalización (J M Goddard and Hotchkiss 2007). Estas moléculas activas pueden ser naturales o sintéticas y poseer diferentes mecanismos de acción (ser bioestáticos o biocidas). En un tercer paso (**C**), es de vital importancia la determinación de la actividad residual de estos compuestos y por lo tanto de los sistemas obtenidos. En este punto se pondera la velocidad de inhibición, los efectos en la matriz, la migración de compuestos, las condiciones de almacenamientos, entre otros.

### **A) Modificación superficial del material polimérico**

La superficie de un polímero es la principal partícipe de todas las interacciones físicas y químicas que éste mantiene con su entorno y en la mayoría de los casos, sus características definen el comportamiento y las propiedades para su uso en determinadas aplicaciones. La mayoría de los materiales poliméricos tienen características hidrofóbicas, son químicamente inertes y presentan inconvenientes de adhesión, impresión, recubrimiento, etc. Para mejorar estas propiedades, se han desarrollado numerosas técnicas de modificación superficial, que son capaces de introducir una amplia gama de grupos funcionales y por lo tanto alterar las propiedades físicas y químicas de la superficie polimérica, sin afectar las propiedades de “*bulk*” o de masa. Para conseguir una funcionalización de estas características, es necesario que el espesor de la lámina

modificada sea lo más delgada y uniforme posible, debido a que láminas gruesas pueden cambiar propiedades que se desean conservar, como por ejemplo la estabilidad térmica, las propiedades mecánicas, entre otras. También es preferible que la modificación generada sea resistente y estable en el tiempo, en especial cuando es responsable de la adsorción de una biomolécula (Kato et al. 2003).

Las técnicas de modificación superficial, por lo general incluyen tanto procesos físicos como químicos. Los primeros, aprovechan la segregación de la superficie, radiación con ondas electromagnéticas u oxidación con gases. En tanto que los segundos, utilizan tratamientos con reactivos específicos, mezclas o "*blends*", recubrimientos, metalizaciones, etc. Ambos tipos de procesos, por sí solos son capaces de introducir una gran cantidad e inespecífica gama de grupos funcionales. Cuando el objetivo de estas modificaciones es que las mismas actúen como precursoras para la unión de una determinada molécula bioactiva, estas técnicas deben ser llevadas a cabo de modo que los grupos funcionales introducidos sean completamente específicos (J.M. Goddard and Hotchkiss 2007). La combinación de ambos tipos de procesos, representa hoy en día una de las estrategias más ventajosas en lo que respecta a la modificación superficial específica.

Las reacciones de injerto o "*grafting*", son una metodología que presenta numerosas ventajas con respecto a otras técnicas de modificación superficial. En esta técnica, la funcionalización de la superficie es llevada a cabo gracias al injerto de monómeros que contienen grupos funcionales de interés. Es ideal para la introducción controlada y precisa de cadenas poliméricas, sin afectar las propiedades de *bulk*. Adicionalmente, la unión covalente de estas cadenas a la matriz polimérica, asegura una gran estabilidad a lo largo del tiempo, a diferencia de las técnicas físicas de funcionalización convencionales (Kato et al. 2003).

Con el objetivo de copolimerizar distintos monómeros en matrices poliméricas, se han desarrollado numerosos métodos que incluyen radiación con electrones de alta energía, radiación gamma, rayos X, activación por ozono, activación química, radiación UV, radiación VUV, radiación plasma, descarga corona, entre otras (Bilongo, Remigy, and

Clifton 2010; Chiang et al. 2009; Dargaville et al. 2003; J Deng et al. 2009; Jianping Deng et al. 2008; Gupta, Krishnanand, and Deopura 2012; Lei and Liao 2001; Oshima et al. 2011; Rajajeyaganthan et al. 2011; Sciaratta et al. 2003)

A continuación se realizará un breve descripción de las técnicas con mayor potencial de aplicación a gran escala y que son de especial interés para el desarrollo de este trabajo.

#### Tratamiento por descarga corona

La descarga corona es un método simple, económico y continuo, que normalmente es empleado en la industria del plástico para mejorar las propiedades de impresión y adhesión de la superficie de películas plásticas (PP, PE, PVC, PET, etc.). La descarga corona consiste en una corriente eléctrica inducida, capaz de ionizar el aire circundante al polímero. De este modo las moléculas de gas activadas, pueden reaccionar con las cadenas poliméricas superficiales y generar especies con elevada concentración de oxígeno (cetonas, aldehídos, peróxidos, grupos carboxílicos, oxhidrilos). Las desventajas que presenta esta metodología, son su baja especificidad, el riesgo a contaminaciones y la notable susceptibilidad a factores como la temperatura y la humedad. Además, los grupos polares resultantes, son particularmente inestables, lo que obliga a utilizar a las superficies modificadas, inmediatamente después de realizar el tratamiento (Oyane A et al. 2005).

Existen numerosos reportes acerca del uso de esta metodología, para llevar a cabo reacciones de injerto en la superficie de polímeros con distintas aplicaciones (Kalapat and Amornsakchai 2012; Lei and Liao 2001; M. Ragoubi et al. 2012; Mohamed Ragoubi et al. 2010; Su et al. 2014; Zhu et al. 2007).

#### Tratamiento Plasma

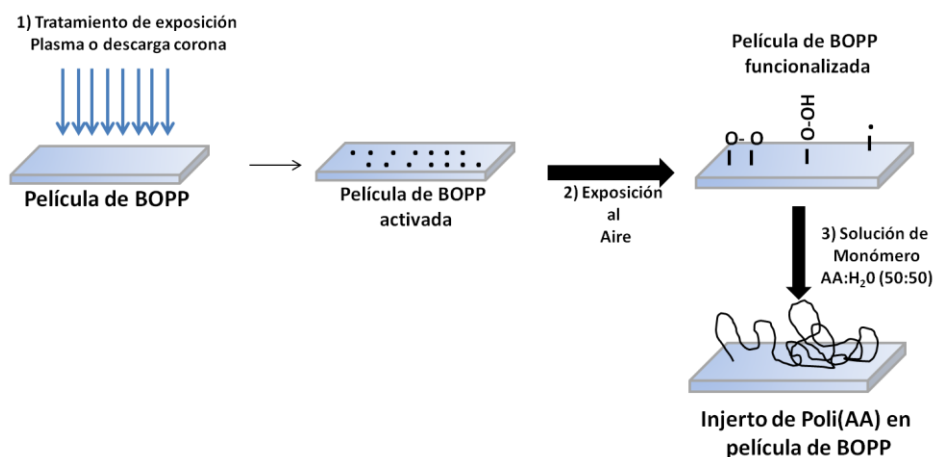
La materia en estado de plasma, puede generar en la superficie de los polímeros modificaciones a escala nanométrica, sin la necesidad de reactivos químicos y la producción de desechos. La funcionalización obtenida depende del tipo de plasma utilizado (plasma de O<sub>2</sub>, Ar, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> ó NH<sub>3</sub>) y de los parámetros seleccionados

(Presión, potencia, tiempo, flujo de gas, etc.). Esta metodología es utilizada en la industria del plástico, para incrementar las propiedades de adhesión e impresión, aunque también suele emplearse para la limpieza de películas plásticas y otras funciones especiales. Por lo general, los cambios químicos producidos por este tratamiento, suelen ser más definidos y específicos que los conseguidos mediante descarga corona; sin embargo suele ser costosa y difícil de aplicar en procesos continuos a gran escala (J.M. Goddard and Hotchkiss 2007; Ratner and Hoffman 2013).

El tratamiento plasma tiene la energía suficiente para romper enlaces de la superficie del material y generar radicales reactivos que son capaces de iniciar reacciones de copolimerización en presencia de diferentes monómeros vinílicos (Bhattacharya 2004). Esta estrategia de modificación a través del injerto en la superficie, ha sido empleada para conseguir una gran variedad de aplicaciones: en el desarrollo de materiales biomédicos (Ratner and Hoffman 2013), superficies antibacterianas (Zhang et al. 2006), en la modificación de polímeros biodegradables (Gupta, Krishnanand, and Deopura 2012), en la funcionalización de poliolefinas sintéticas (Sciarratta et al. 2003; Sun et al. 2010; Wang and Chen 2007) (Oehr et al. 1999), en la modificación de materiales textiles (Gupta 2000), el desarrollo de membranas selectivas (Kang and Kiel 1996), etc.

En general, los procedimientos para efectuar las reacciones de injerto mediante tratamiento plasma o descarga corona, pueden realizarse de tres maneras diferentes: i) a través de la activación de la superficie polimérica en presencia del monómero a injertar en fase gaseosa; ii) sumergiendo en una solución del monómero a la superficie activada luego del tratamiento y iii) permitiendo que el sustrato polimérico activado, reaccione con el oxígeno atmosférico para generar peróxidos, los cuales servirán de precursores de la reacción de injerto, en un paso posterior (Oehr et al. 1999). Cada uno de estos procedimientos tiene sus limitaciones, mayoritariamente instrumentales. En el caso particular de este trabajo, se optó por una configuración del tipo secuencial, más precisamente acorde a la tercera estrategia mencionada (iii). En la Figura 1.5.2 se muestra esquemáticamente dicho procedimiento, aplicable a los tratamientos con ambas fuentes de energía (plasma y corona) (Bhattacharya 2004).





**Figura 1.5.2.** Técnica de injerto mediante previa activación plasma o descarga corona.

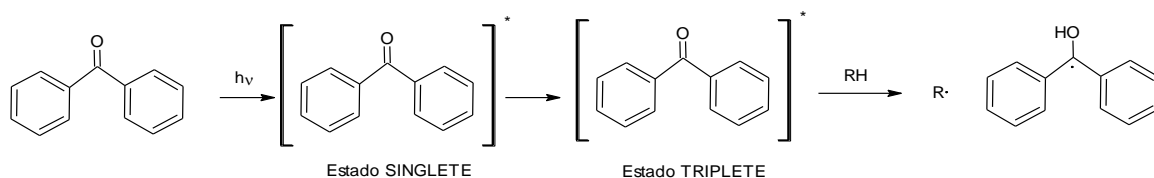
#### Tratamiento por Radiación UV. Reacción de Fotoinjerto

Cuando la superficie de un polímero es expuesta a luz UV, en ella se generan sitios reactivos que pueden derivar en diferentes grupos funcionales o bien ser utilizados para iniciar reacciones de polimerización sobre la superficie del material. Este tipo de técnica, denominada fotoinjerto o “*photo-grafting*”, difiere de las que utilizan gases ionizados, por su habilidad para mantener intactas las propiedades del *bulk* polimérico; confinando la modificación únicamente a la superficie irradiada. Esta característica se puede conseguir variando la longitud de onda de la radiación y por lo tanto la absorción del polímero. Otras características, son que las polimerizaciones de injerto inducidas por luz UV, poseen rápidas velocidades de reacción, bajo costo de procesamiento, no requieren de equipamiento complejo y por lo tanto son de fácil aplicación en la industria (J Deng et al. 2009; J M Goddard and Hotchkiss 2007).

Las macromoléculas que constituyen el polímero, al absorber luz UV pueden pasar a un estado excitado y luego disociarse en radicales libres que iniciaran la reacción de polimerización. Si la absorción de luz no genera los sitios reactivos resultantes de las rupturas de cadena, entonces dicho proceso puede ser promovido mediante el uso de fotoiniciadores. Estos compuestos generalmente son moléculas con grupos cromóforos en su estructura, que al absorber radiación UV son capaces de generar especies reactivas que

pueden abstraer un átomo de hidrogeno de la superficie del polímero y de esta manera formar los radicales necesarios para iniciar la reacción de polimerización (Bhattacharya 2004; Costamagna 2006).

Uno de los iniciadores más utilizados en las reacciones de fotoinjerto, es la benzofenona (BF). Cuando la molécula de BF es irradiada con luz UV, esta es excitada a un estado singlete que espontáneamente deriva a un estado triplete, capaz de abstraer un átomo de hidrógeno del sustrato y consecuentemente generar en la superficie, radicales libres que inicien la reacción de copolimerización. El radical benzopinacol resultante, al tener baja reactividad no interviene en la reacción de propagación, pero si participa en las reacciones de terminación por acoplamiento. En la Figura 1.5.3 se muestra el mecanismo propuesto para la activación y formación de radicales libres mediante el uso de BF y luz UV (J Deng et al. 2009).



**Figura 1.5.3.** Mecanismo de activación y formación de radicales libres por radiación de BF.

Generalmente las reacciones de fotoinjerto pueden llevarse a cabo utilizando luz UV perteneciente a un amplio rango de longitudes de onda. Sin embargo, es sabido que las longitudes de onda menores a 300 nm, tienen una mayor eficiencia para la iniciación de estas reacciones. (YangWT et al. 1996) ( Xu SG, Sun YF, Du JM, Yang WT 2000). La benzofenona tiene una absorción óptima en el rango de 240- 350 nm, el cual puede conseguirse fácilmente con lámparas de xenón o de mercurio de media y baja presión, entre otras.

Dado a que el proceso de injerto implica la unión covalente entre el monómero y las cadenas del sustrato, la naturaleza del polímero (características físicas, composición química, etc.) juega un papel fundamental en este proceso. Un ejemplo es la dependencia de la velocidad de la reacción de injerto, en relación a la fracción amorfa o cristalina del polímero (Bhattacharya 2004).

Al igual que las cadenas del polímero, la naturaleza y reactividad del monómero injertado es de suma importancia. La reactividad de los monómeros depende de varios factores entre ellos estéricos, polaridad, solubilidad, concentración, etc. El monómero ácido acrílico (AA) es de especial interés para el desarrollo de este trabajo, ya que a través de su injerto en la superficie polimérica, brinda la posibilidad de introducir grupos -COOH, que pueden servir como puntos de unión para numerosas moléculas bioactivas. Este es un monómero polar, soluble en agua y que en concentraciones elevadas puede sufrir reacciones de homo-polimerización. Sin embargo, en soluciones diluidas y cuando se utiliza BF como fotoiniciador, la homopolimerización es relativamente baja (Bhattacharya 2004; Costamagna 2006).

El fotoinjerto de películas plásticas también puede llevarse a cabo en presencia de los vapores del monómero (Rajajeyaganthan et al. 2011; Weibel et al. 2009), o bien con el auxilio de un solvente conteniendo el monómero y el fotoiniciador. En este último caso, el solvente es el encargado de transportar al monómero hasta la proximidad de las cadenas poliméricas para que lleve a cabo la reacción de injerto. Su elección depende de varios parámetros, como ser la solubilidad del monómero, las propiedades de hinchamiento del polímero, la miscibilidad, entre otros. Un hecho acerca de la importancia de su elección, es que la profundidad del injerto está controlada por el nivel de interacción polímero-solvente; entonces, si la penetración o interacción del solvente es importante, las cadenas comenzarán a crecer desde el interior del material, afectando las propiedades de la masa polimérica. Desde este punto de vista, el injerto de AA en películas poliolefínicas (PP, PE, PVC, etc.) utilizando agua como solvente, es muy ventajoso ya que asegura una modificación estrictamente superficial.

La modificación de superficies plásticas mediante el injerto de monómeros, es sin lugar a duda una técnica muy valiosa, que permite otorgar propiedades superficiales especiales. El carácter covalente de este tipo de funcionalización, asegura la permanencia en el tiempo de estas propiedades.

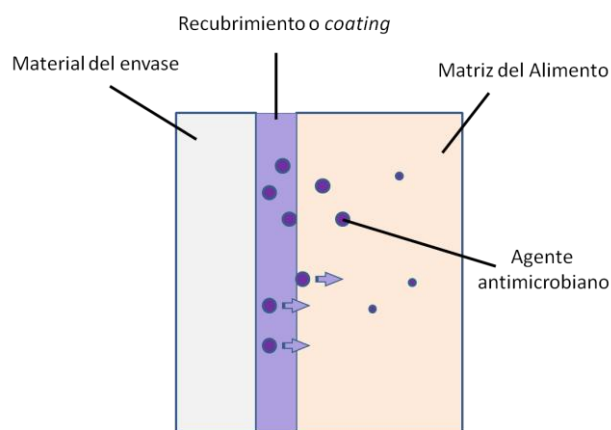
En superficies modificadas por técnicas físicas como la descarga corona, el tratamiento plasma, ozono, etc., la introducción de grupos funcionales polares aumenta la

energía superficial mejorando la impresión, adhesión, etc. Sin embargo, espontáneamente estos grupos funcionales tienden a migrar al interior de la masa polimérica para disminuir la energía superficial a lo largo del tiempo. Este fenómeno es llamado “recuperación de la hidrofobicidad” y representa un serio inconveniente para la biocompatibilidad, inmovilización de biomoléculas y otras aplicaciones. El anclaje covalente de cadenas poliméricas a través de las reacciones de injerto, es una estrategia efectiva para evitar estos efectos dependientes del tiempo, asegurando la continuidad de la funcionalización y por lo tanto la posibilidad de inmovilizar moléculas bioactivas (Galvin and Genzer 2012; J.M. Goddard and Hotchkiss 2007; Kalapat and Amornsakchai 2012).

## **B) Incorporación del agente antimicrobiano (Bio-funcionalización)**

Para lograr obtener películas antimicrobianas, cuyo potencial sea el de formar parte de envases activos para alimentos, es necesario la incorporación de agentes bioactivos que le confieran dicha característica a la superficie del material.

Por lo general existen dos maneras de incorporar estas moléculas a la superficie polimérica: La primera de ellas es a través del recubrimiento o “*coating*” de las superficies o películas destinadas a formar parte del envase y la segunda, es a través de la inmovilización específica del agente antimicrobiano en la superficie del material.



**Figura 1.5.4.** Recubrimiento antimicrobiano. Superficie polimérica en contacto con la matriz alimenticia.

### Recubrimiento o “coating” de las superficies

En estos casos el *coating* sirve como medio de transporte para que los compuestos antimicrobianos puedan migrar hacia la superficie del alimento y ejercer su acción antibacteriana o antifúngica (Figura 1.5.4). La eficiencia con que estos compuestos pueden inhibir la flora superficial, dependerá principalmente de la velocidad a la cual se lleva a cabo la migración y a la velocidad a la cual se desarrollen los microorganismos presentes en la superficie. Por ejemplo, si la velocidad de transferencia de masa del agente activo es mayor que la velocidad de crecimiento de los microorganismos, es probable que el agente antimicrobiano se diluya en la matriz alimenticia, pudiendo llegar a concentraciones inferiores a la mínima necesaria para inhibir el desarrollo de los microorganismos, consecuentemente, estos crecerían a medida que la concentración de antimicrobiano decaiga. De manera similar, si la velocidad de liberación es inferior a la velocidad de crecimiento de la flora microbiana, los microorganismos podrían desarrollarse incluso antes que el compuesto sea liberado, con lo cual el envase antimicrobiano perdería totalmente su eficiencia (Han 2005; Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014)

Por lo tanto, el riguroso conocimiento de los procesos de transporte del antimicrobiano, de la matriz alimenticia y de los microorganismos que se desea inhibir, son consideraciones indispensables a tener en cuenta en el desarrollo de esta clase de envases activos.

Algunos ejemplos de envases antimicrobianos a base de recubrimientos son: películas de polietileno, recubiertas con policloruro de vinilideno con nisina y natamicina incorporada para la preservación de quesos (Hanušová et al. 2010), o superficies celulósicas embebidas en aceites esenciales, que recubren los materiales plásticos de envases en contacto con productos cárnicos (Coma 2008).

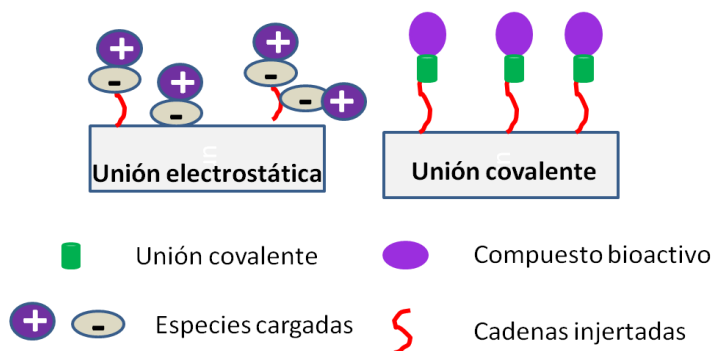
### Inmovilización específica del agente antimicrobiano

Para conseguir la inmovilización en la superficie polimérica, se requiere la presencia de grupos funcionales específicos tanto en el agente activo, como en la superficie del material. Algunos ejemplos de antimicrobianos con grupos funcionales

específicos son las enzimas, poliaminas, péptidos y ácidos orgánicos. Los polímeros o copolímeros, con grupos funcionales éster, halógenos, bencilo, oxhidrilo, amida y ácidos carboxílicos, son excelentes candidatos para la función de soporte de estos agentes antimicrobianos u otros compuestos utilizados no solo en la industria alimenticia, sino también en la textil, biomedicina, electrónica, entre otras (J M Goddard and Hotchkiss 2007).

Además de la presencia de grupos funcionales específicos, en la mayoría de los casos también es necesario que existan “espaciadores” que unan a la matriz polimérica con el compuesto bioactivo. Estos espaciadores, permitirían que la molécula activa tenga la suficiente libertad para interactuar con los componentes celulares de los microorganismos y así cumplir con su mecanismo de acción antimicrobiano (Appendini and Hotchkiss 2002b; Huang and Xu 2010).

Todos estos requisitos, generalmente se cumplen en películas que previamente han sido funcionalizadas por alguna de las técnicas de injerto descritas anteriormente. Para este tipo de superficies, se diferencian dos estrategias de inmovilización del agente antimicrobiano: la inmovilización por interacción iónica y la inmovilización covalente. En la Figura 1.5.5, se muestra gráficamente este tipo de inmovilización del agente activo.



**Figura 1.5.5.** Inmovilización específica de agente bioactivo: interacción iónica e interacción covalente

- *Inmovilización iónica.*

La inmovilización iónica del agente antifúngico, puede efectuarse cuando el antimicrobiano o el soporte polimérico, poseen grupos funcionales capaces de desarrollar cargas opuestas el uno del otro. Para que esto ocurra, el proceso de inmovilización debe

ser llevado a cabo en las condiciones adecuadas (solubilidad, pH, fuerza iónica). Este tipo de inmobilizaciones no covalentes, son deseables en ciertas aplicaciones donde se requiere la liberación del compuesto activo (Richey et al. 2000a). Algunos antecedentes acerca de la inmobilización iónica de diversos compuestos en soportes poliméricos, son la unión de benomilo, cloruro de benzoilo y bacteriocinas a películas ionoméricas; o la inmobilización electrostática de argatroban (anticoagulante) en catéteres de polietileno injertados con poli ácido acrílico.

- *Inmovilización covalente*

En la inmobilización covalente, la unión es mediada por un enlace formal entre la molécula bioactiva y la matriz polimérica. En aplicaciones como envases para alimentos, estos sistemas consiguen evitar la migración del agente activo y de este modo, asegurar la calidad e inocuidad química del producto. En biomedicina, un anclaje de este tipo, tiene la ventaja de extender el tiempo de vida media de una biomolécula, ya que previene su metabolización y permite una continuidad en su actividad biológica. Otra ventaja que presentan estos diseños, es la posibilidad de obtener superficies muy efectivas utilizando pequeñas cantidades de compuesto bioactivo (Charnley, Textor, and Acikgoz 2011). Una desventaja, es que la inmobilización covalente puede reducir la actividad biológica de las sustancias de interés, debido a factores estéricos o la imposibilidad de la droga para interactuar con componentes intracelulares (M. Bagheri et al.2009; R. Kuehl et al. 2009). Los cambios generados en el microambiente del compuesto, los reordenamientos en la superficie y todos aquellos factores que impliquen alguna modificación en el mecanismo de acción del agente antimicrobiano, son en muchos casos, los responsables de la baja actividad residual de los compuestos inmobilizados (Ahuja et al. 2007).

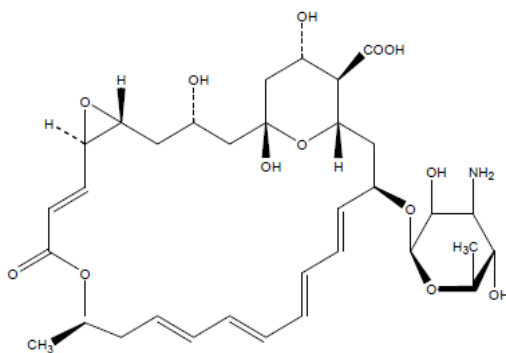
#### *Elección del agente antimicrobiano*

Para la producción de envases antimicrobianos, varios agentes bioactivos pueden ser incorporados en los dispositivos o materiales que constituyan al envase. La condición fundamental, es que estos agentes antimicrobianos sean de grado alimenticio y por lo

tanto esté permitido su uso en alimentos. Estos compuestos bioactivos generalmente pueden ser divididos en tres grupos: agentes químicos (en su mayoría ácidos orgánicos y derivados, como ser el sorbato de potasio), agentes naturales (aceites esenciales, extractos, etc.) y probióticos (por ejemplo *Lactobacillus reuteri* para el control de *Escherichia coli*) (Han 2013; Muthukumarasamy and Holley 2007).

El agente antimicrobiano escogido para el desarrollo de este trabajo, fue la natamicina (NAT), también conocida como pimarcina (Figura 1.5.6). La NAT es un agente antifúngico natural, producido por *Streptomyces natalensis* y es comúnmente utilizado en la industria alimenticia como inhibidor del crecimiento de mohos y levaduras. Ha sido aprobado como aditivo alimentario por más de 40 países, incluyendo Argentina, a través del Código Alimentario Argentino (Ollé Resa, Jagus, & Gerschenson, 2014 , C.A.A, 2010). Este compuesto, presenta especificidad sobre hongos y levaduras pero no sobre bacterias, virus y protozoos, lo cual es extremadamente útil para evitar la proliferación de mohos y levaduras en alimentos donde su producción incluye la actividad metabólica de bacterias; por ejemplo vinos, yogures, jugos y la mayoría de los quesos.

Los mecanismos de acción del compuesto no son del todo conocidos, sin embargo estudios de transporte de membrana, indicarían que NAT se une específicamente al ergosterol presente en la célula, afectando sus funciones principales (Atta et al. 2012).



**Figura 1.5.6.** Estructura química de la Natamicina.

En la actualidad, la manera más frecuente de aplicación de NAT en alimentos sólidos, es a través del pintado o “esprayado” de los mismos a nivel superficial. Este modo



de uso, puede generar algunas limitaciones en las ventajas que ofrece este producto. La más común, es el descenso en la concentración activa del compuesto, debido a interacciones o reacciones que éste puede sufrir con componentes u otros aditivos presentes en la superficie del alimento. Otra de las consecuencias a tener en cuenta, es la difusión del antimicótico al seno del alimento, lo cual disminuye su concentración superficial y además puede significar la ingesta directa del mismo al consumir el producto (Hanušová et al. 2010; Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014).

Como se mencionó anteriormente, la incorporación de agentes antimicrobianos a interfaces o películas que sean capaces de retener y ayudar a disminuir la velocidad de difusión del agente y su reacción con otros compuestos del alimento, es de suma utilidad e importancia. En este sentido, la forma en que son incorporadas las biomoléculas y sobre todo las características de la superficie, son aspectos fundamentales a tener en cuenta en el diseño de los envases activos.

### **C) Evaluación de la efectividad antimicrobiana de los materiales**

El deterioro microbiano daña los pilares fundamentales de calidad y de aceptación de un alimento. El crecimiento de microorganismos puede causar olores y sabores indeseados, cambio en el color y la textura, además de generar toxinas que pongan en riesgo la seguridad del producto y por lo tanto la del consumidor. En alimentos sólidos y semisólidos, la contaminación microbiológica se lleva a cabo principalmente en la superficie, es por esto que la actividad antimicrobiana o inhibitoria a los fines de su preservación, debe estar destinada al entorno o la superficie del alimento envasado (Coma 2008; Han 2005).

Los envases antimicrobianos son sistemas capaces de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos, con el objetivo de extender la vida útil de alimentos perecederos y resguardar al mismo tiempo su seguridad microbiológica. Esto lo consiguen creando condiciones desfavorables en el entorno del microorganismo, ya sea sustrayendo algún componente esencial para su desarrollo o simplemente poniendo en contacto algún agente antimicrobiano específico (Han, 2013).

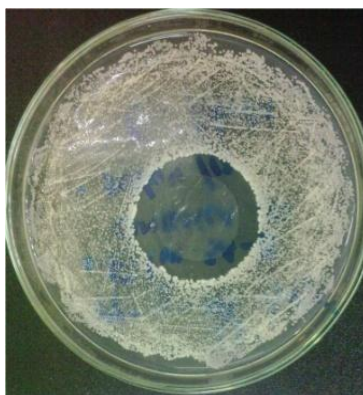
Conocer el microorganismo a inhibir, el antimicrobiano seleccionado, el material del cual está hecho el envase y la composición del alimento, son todos aspectos fundamentales a tener en cuenta en el diseño de un envase antimicrobiano y que luego determinarán su efectividad y potencial aplicación.

Al igual que todos los agentes antimicrobianos, aquellos que son incorporados en el material del envase, tienen que ser seleccionados según su espectro de acción, modo de acción, composición química y teniendo en cuenta la tasa de crecimiento de los microorganismos a inhibir. La unión de los agentes activos al material polimérico, debe permitir conservar el modo de acción del compuesto, ya que esto está relacionado con su actividad antimicrobiana. Los aditivos presentes en el polímero, como ser plastificantes, antiestáticos, lubricantes, rellenos, etc., no deben interactuar con el agente antimicrobiano de manera desfavorable, debido a que esta interacción puede afectar negativamente la actividad antimicrobiana. Por otra parte, la presencia del compuesto bioactivo en la superficie del polímero, también puede alterar las propiedades de termosellado, impresión o adhesión del material (Appendini and Hotchkiss 2002b; Appendini 1996).

Existen métodos oficiales para determinar la resistencia de un material al accionar de distintos microorganismos (ASTM G21-96 2002); sin embargo no se encuentran métodos estándar que permitan determinar la efectividad de materiales antimicrobianos (Appendini and Hotchkiss 2002b). Una metodología que se aproxima a este propósito, fue desarrollada en Japón alrededor de 1998 y permite determinar la resistencia al crecimiento de bacterias en materiales hidrofóbicos (JIS Z 2801: 2000), esta técnica fue concebida originalmente para polímeros rígidos que tuviesen incorporados iones plata como función antimicrobiana (Standar Japanese 2000).

Para evaluar la efectividad de un envase antimicrobiano, la mayoría de los estudios son realizados utilizando medios de cultivos, los cuales proveen las condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos y también para el accionar de los envases antimicrobianos (Han 2013). Dentro del conjunto de ensayos microbiológicos en medios de cultivo, el más popular para poner en manifiesto la efectividad de polímeros

antimicrobianos, es el ensayo de “difusión en placa” ó *in vitro*. Este se basa en la capacidad del material para suprimir o inhibir el crecimiento de los microorganismos seleccionados, cuando el polímero es puesto en contacto directo con una superficie de agar sólido previamente inoculada (Figura 1.5.7). Este método, intenta simular la envoltura de los alimentos y puede sugerir los acontecimientos que ocurren cuando el material entra en contacto con la superficie contaminada y se lleva a cabo la migración del agente bioactivo (Appendini and Hotchkiss 2002b).



**Figura 1.5.7.** Ensayo de difusión en placa para película antimicrobiana.

Por lo general, el crecimiento de los microorganismos en los medios de cultivo no es el mismo que en la superficie de los alimentos, ya que en estos últimos, la falta de ciertos nutrientes y las condiciones de estrés que deben soportar los microorganismos, suelen afectar su desarrollo. Por otro lado, la interacción entre el agente antimicrobiano, los microorganismos y las sustancias que componen al alimento, en muchas ocasiones hacen que la efectividad de los sistemas bioactivos no sea la demostrada en los ensayos realizados en medios de cultivo. Por estas razones, es indispensable que los experimentos para determinar la efectividad de los envases antimicrobianos, también sean llevados a cabo en alimentos reales (Han 2005; Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es que los envases que se encuentran en contacto directo con alimentos e interaccionan con ellos, deben cumplir con normas estrictas en lo que refiere a la migración de sustancias y a la presencia de ciertos aditivos. El cumplimiento, o no de estas normativas, sin lugar a duda debe ser ponderado en la

evaluación final de los sistemas antimicrobianos destinados a utilizarse como envases (Kopper and Ariosti 2010).

## **1.6 Importancia y antecedentes que impulsan el presente trabajo**

El mercado de envases flexibles se caracteriza por el continuo desarrollo de materiales y estructuras orientados a mejorar la preservación, presentación y comunicación de los productos contenidos. El desarrollo de nuevos materiales “bioactivos” para ser utilizados como envases de alimentos y con la propiedad de evitar la formación de microorganismos, se enmarca claramente dentro de ese contexto, como una alternativa evolutiva a la situación actual.

El sector industrial de fabricación de películas flexibles se caracteriza por poseer alta tecnología de producción y transformación, no obstante, habitualmente se limita a combinar los materiales comercialmente existentes y el desarrollo de nuevos productos, se encuentra condicionado a los materiales que ofrecen los proveedores del sector. Sin embargo, existen algunas empresas fabricantes de envases flexibles con capacidad de fabricación y/o transformación de películas, que sortean esta limitación proponiendo nuevas películas surgidas desde el seno de sus establecimientos. Precisamente, este afán por el desarrollo de nuevas películas con propiedades adicionales a las tradicionales de barrera, impulsó el presente trabajo de Tesis, como una estrategia de diferenciación y superación de los actuales envases disponibles en el mercado. Dentro de estos nuevos materiales y en particular en este trabajo, el desarrollo de películas activas biológicamente, surge de la natural exigencia del sector industrial destinado a la manufactura, envasado y distribución de alimentos, para ofrecer productos en mejores condiciones de preservación, haciendo uso de nuevas tecnologías y materiales que a la vez carezcan de riesgos ambientales y sociales.

Experiencias realizadas en el Grupo de Investigación de Polímeros de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, especialmente por Costamagna *et al.*, permitieron arribar a resultados promisorios acerca de modificación química superficial de películas de origen comercial y posterior unión de compuestos con valor

agregado. Estos antecedentes, conforman uno de los pilares fundamentales sobre los cuales se gestó el presente desarrollo tecnológico y trabajo de Tesis.

La importancia del presente trabajo, radica en optimizar e implementar tecnologías de activación superficial, estudiar la posibilidad de reducir y/o eliminar la utilización de sustancias conservantes en el alimento mismo y además incrementar su período de aptitud para el consumo. Esta innovación es muy importante por el impacto directo en la calidad de vida de los consumidores, ya que aspira a que los mismos no ingieran sustancias químicas que no tienen una finalidad nutricional y que solo son utilizadas a los fines de extender la vida útil del alimento.

### **1.7 Objetivos planteados para el desarrollo del presente trabajo de Tesis.**

Bajo las perspectivas mencionadas anteriormente y atendiendo a las exigencias planteadas por empresas locales del sector alimenticio y también abocadas a la producción y comercialización de envases; en el trabajo de Tesis se plantó como objetivo general obtener películas flexibles bioactivas, que puedan ser utilizadas como envase de contacto directo con alimentos y que retarden o inhiban el desarrollo de microorganismos en la superficie de contacto.

Para cumplimentar con el objetivo general planteado, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar las condiciones necesarias para la activación y modificación por injerto o “*grafting*” mediante tratamiento plasma, descarga corona y UV, de películas plásticas aptas para uso como envases de alimentos.
- Optimizar el anclaje del antifúngico natamicina sobre diferentes películas previamente modificadas.
- Poner en práctica métodos para determinar el grado de fijación de natamicina en las películas previamente tratadas.
- Determinar propiedades físicas y biológicas de las películas bioactivas resultantes, que posean viabilidad tecnológica.

## **Capítulo 2: Desarrollo experimental**



## 2.1 Materiales

Las películas de polipropileno biorientado (BOPP) utilizadas en el presente trabajo de Tesis, fueron provistas por CONVERFLEX ARGENTINA S.A. Las mismas tenían un espesor promedio de 22 micras y una de las caras termosellable. Las películas provistas, fueron tratadas previamente en fábrica mediante tratamiento Corona en una de sus caras (42 dyn/cm<sup>2</sup>).

La matriz alimenticia seleccionada para llevar a cabo los diferentes ensayos en el trabajo de Tesis, fue “queso fresco o cremoso”. Se evaluó la utilización de tres quesos diferentes, disponibles comercialmente: PortSalud de “LA SERENISIMA”; queso “RAMOLAC” y queso “DUY AMIS”, siendo este último el seleccionado para ser utilizado en el desarrollo del presente trabajo de Tesis. En la tipificación provista por el fabricante de cada uno de estos quesos, según el C.A.A. (Capítulo VIII, Artículo 605), los mismos corresponderían a quesos de elevada humedad (humedad entre 46,0 y 54,9%).

Se utilizaron los siguientes reactivos y solventes:

Ácido acrílico (AA) anhidro 99%, ALDRICH; benzofenona (BF) 99%, SAFC; hidróxido de sodio (NaOH), ANEDRA; acetona p.a, CICARELLI; barniz de polimetacrilato de metilo en acetato de etilo; acetato de etilo, CICARELLI; hexano g.p., SINTORGAN; ácido clorhídrico (HCl), CICARELLI; fosfato biácido de sodio anhidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), BIOPACK; fosfato ácido de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), BIOPACK; natamicina grado alimenticio, PROQUIGA, nitrógeno (N<sub>2</sub>), PRAXAIR; N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) 99%, ALDRICH; dimetilformamida (DMF) grado HPLC, SINTORGAN; metanol (MeOH), CICARELLI; ácido acético glacial (Ac), CICARELLI; agar mohos y levaduras, BRITANIA; caldo cerebro corazón, BRITANIA; fenosftaleina.

## 2.2 Equipos

- Lámpara NNI 40/20 con amalgama de In; emisión a 254 nm; 260 mm de longitud; 40 W input power; Sistema reflector con refrigeración forzada.
- Fotorreactor de acrílico con bandeja móvil.



- Equipo industrial de tratamiento Plasma.
- Equipo industrial de tratamiento por descarga Corona.
- Espectrofotómetro UV- Visible T60-U, PG INSTRUMENTS.
- Equipo de espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), NICOLET 5-SXC.
- Accesorio de FT IR de Reflexión Total Atenuada de ZnSe /45°, THERMO SCIENTIFIC SMART MULTI-BOUNCE.
- Microscopio de ángulo de contacto.
- Balanza de precisión, AND GR200.
- Autoclave, Gabinete de seguridad biológica, Estufas de cultivo, vórtex.

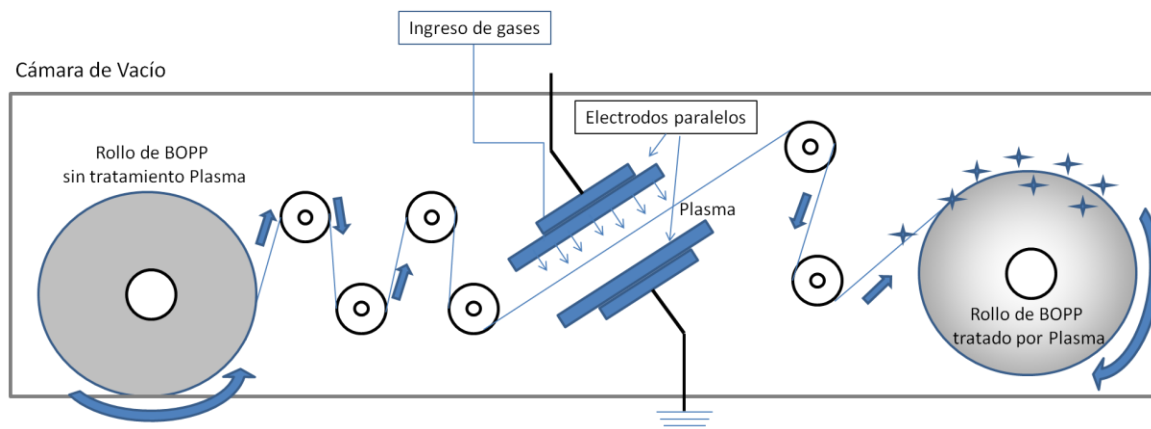
## 2.3 Procedimientos

### 2.3.1 Modificación superficial de películas de BOPP

- *Pruebas de injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante previa activación a través de tratamiento plasma.*

La activación mediante tratamiento plasma fue realizada en un equipo industrial, destinado habitualmente a la limpieza de la superficie plástica de BOPP y a la producción de películas metalizadas de ese mismo material. La experiencia fue realizada en las instalaciones de la planta de CONVERFLEX ARGENTINA S.A.

La prueba del injerto de AA en películas de BOPP previamente activadas por tratamiento plasma, se realizó en dos etapas secuenciadas. La primera etapa consistió en la exposición del BOPP a la fuente plasma del equipo utilizado. En la Figura 2.3.1 se muestra ilustrativamente el funcionamiento global de dicho equipo.



**Figura 2.3.1.** Esquema del funcionamiento del equipo de tratamiento plasma utilizado.

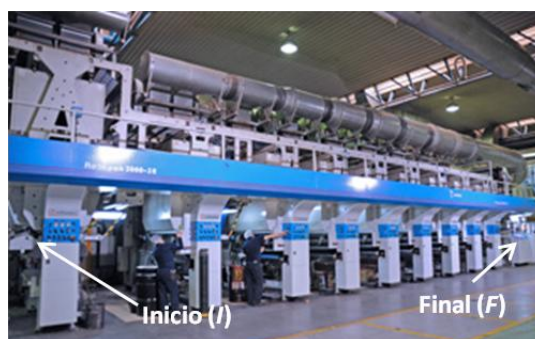
En la experiencia se variaron los parámetros correspondientes a la velocidad de circulación del material y a la composición de gases del plasma, propiamente dicho. Una vez en funcionamiento el equipo, se hizo transitar una vasta cantidad del material por entre las placas de fuente plasma (Figura 2.3.1). Posteriormente se procedió a presurizar la cámara de vacío con el equipo fuera de funcionamiento y se seleccionó una superficie del material (40 cm x 25 cm), proveniente del interior del rollo de BOPP modificado.

En la segunda etapa de la experiencia, correspondiente al injerto de AA, la superficie de BOPP activada por plasma fue transferida a un recipiente conteniendo una solución de AA: H<sub>2</sub>O (50:50; v/v) por un periodo de 12 hs. Transcurrido este tiempo, las películas fueron retiradas de la solución del monómero, puestas en contacto con una solución de NaOH (pH= 11) y luego enjuagadas exhaustivamente con agua destilada. Las películas tratadas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas para su posterior caracterización.

○ *Pruebas de Injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante previa activación a través de descarga corona.*

La activación de las superficies de BOPP mediante descarga corona, fue realizada en un equipo industrial, utilizado para incrementar la hidrofiliidad de la superficie del polímero y así facilitar la impresión de tintas. La experiencia fue llevada a cabo en las instalaciones de la planta de CONVERFLEX ARGENTINA S.A.

La metodología para la activación por descarga corona de las superficies de BOPP y el posterior injerto de AA, fue similar al descrito para el tratamiento plasma. En este caso la activación de las películas de BOPP mediante corona, se llevó a cabo variando la potencia de la descarga (3,5 KW y 2,8KW). La velocidad de tránsito de la película polimérica fue de 30 m/min y el ancho de tratamiento (longitudinal) de 30 mm. Se seleccionó muestras de polímero activado en dos puntos del recorrido de la cinta de producción: al inicio (*I*) y al final (*F*), (Figura 2.3.2.). Las superficies seleccionadas fueron sumergidas en una solución de AA: H<sub>2</sub>O (50:50 ; v/v) por un periodo de 12 hs, luego enjuagadas con NaOH (pH= 11) y abundante agua destilada. Las películas ensayadas fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas para su posterior caracterización.



**Figura 2.3.2.** Equipo de descarga corona.

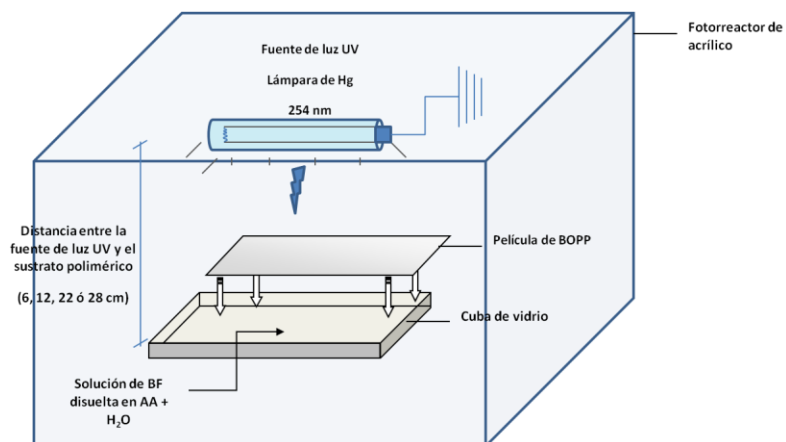
○ Fotoinjerto de AA en solución mediante radiación UV.

Las reacciones de injerto fueron realizadas en un fotorreactor especialmente diseñado para llevar a cabo este trabajo (Figura 2.3.3). El mismo cuenta con una lámpara de mercurio de baja presión, de amalgama y alta intensidad. Esta clase de lámparas, son capaces de emitir hasta diez veces más energía UV que las lámparas clásicas de baja presión, no generan ozono, poseen amplios rangos de temperatura de trabajo y emiten a una longitud de onda específica.



**Figura 2.3.3.** Fotorreactor utilizado para llevar a cabo las reacciones de injerto.

En una cuba de vidrio rectangular, se colocó 1 mL de una mezcla reactiva constituida por volúmenes iguales de agua destilada y de una disolución del fotoiniciador (BF) en AA. Luego se puso en contacto con la solución reactiva, una película de BOPP (17 x 27 cm<sup>2</sup>), asegurándose que todo el volumen de la solución se distribuya homogéneamente en la superficie del polímero. La irradiación del sistema formado por la película de BOPP y la solución reactiva, se llevó a cabo dentro del fotorreactor con luz UV de 254 nm de longitud de onda. En la Figura 2.3.4 se muestra el arreglo experimental utilizado en las reacciones de injerto.



**Figura 2.3.4.** Arreglo experimental para reacción de fotoinjerto de AA en solución.

El procedimiento descrito para la reacción de injerto de AA en las superficies de BOPP, se optimizó mediante la evaluación de las características finales de las películas

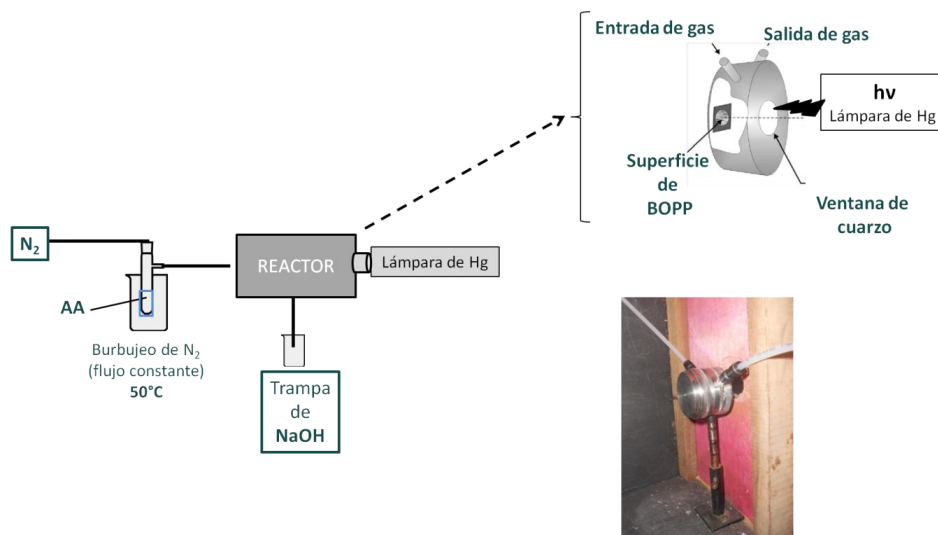
modificadas, debidas a la variación de ciertos parámetros involucrados en la metodología. Estos parámetros fueron: la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica del material (con o sin previo tratamiento corona), la concentración de BF en la solución reactiva (0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 M), el tiempo de irradiación (entre 30 segundos y 7 minutos) y también la distancia existente entre el sustrato y la fuente de luz UV (separaciones de 6, 12, 22 y 28 cm).

Todos los productos obtenidos, antes de ser analizados fueron sumergidos en una solución de NaOH (pH 11) y luego exhaustivamente lavados para remover el homopolímero formado y eliminar los posibles restos de reactivos. Las películas fueron secadas a temperatura ambiente.

- Fotoinjerto de AA en presencia de los vapores del monómero.

Esta experiencia fue realizada con la colaboración del Dr. Daniel Esteban Weibel del Laboratorio de Fotoquímica de Superficies de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul.

A diferencia de las reacciones de injerto mostradas anteriormente, en este caso el injerto de AA se efectuó en presencia de los vapores del monómero y sin la utilización de fotoiniciador: se colocó una película rectangular de BOPP (1,5 cm x 2,5 cm) fija en el soporte metálico de un reactor herméticamente cerrado (Figura 2.3.5). Para generar una atmósfera con vapores de AA dentro del mismo, se burbujeó N<sub>2</sub> a flujo constante (5 mL/seg) mediante una trampa de vacío conteniendo el monómero puro. Este reservorio se colocó en un baño a 50°C y conectado a la entrada de gases del reactor. Luego se procedió a realizar la fotólisis o irradiación del sistema, utilizando una lámpara comercial de mercurio de media presión (250 W) como fuente de luz, la cual fue colimada por una ventada de cuarzo que formó parte del reactor utilizado. Los vapores a la salida del reactor de fotólisis fueron recolectados en un Erlenmeyer conteniendo una solución de NaOH 0,5M. Después de irradiadas las muestras, se hizo circular N<sub>2</sub> (5 mL/seg) por 15 min adicionales para eliminar del interior del reactor todos los vapores. Posteriormente las superficies modificadas fueron enjuagadas con solución de NaOH y lavadas con H<sub>2</sub>O destilada.



**Figura 2.3.5.** Arreglo experimental utilizado en reacciones de fotoinjerto en presencia de vapores del AA.

### 2.3.2 Caracterización de las superficies modificadas superficialmente

- Mediciones gravimétricas

El procedimiento general para calcular el porcentaje de injerto (%G), consistió en pesar las películas plásticas de BOPP antes y después de ser modificadas por las reacciones de copolimerización de AA. El %G se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%G = \frac{m(\text{BOPP} - g - \text{AA}) - m(\text{BOPP})}{m(\text{BOPP})} \times 100$$

Donde  $m(\text{BOPP}-g-\text{AA})$  corresponde a la masa del copolímero de injerto ó sustrato modificado y  $m(\text{BOPP})$  a la masa de sustrato sin modificar, es decir a la masa de la película de BOPP comercial. Las medidas gravimétricas se realizaron con una precisión de 0,1 mg (todos los datos fueron tomados por duplicado).

- Titulación volumétrica de grupos ácidos presentes en superficies de BOPP- g- AA

El numero de equivalentes de grupos  $-\text{COOH}$  presentes en las películas de BOPP- g-AA, fueron determinados por titulación volumétrica por retroceso con una solución de

NaOH 0,036 M. El NaOH en exceso fue titulado con una solución de HCl 0,0517 M, utilizando fenolftaleína como indicador.

- *Espectroscopia infrarroja.*

Todos los espectros obtenidos se realizaron directamente sobre las películas modificadas y sin modificar, con el fin de analizar diferencias en las estructuras químicas del sustrato y del producto. Para esto se utilizó un FT-IR Nicolet 5-SXC en modo de transmitancia y de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Todos los espectros fueron realizados con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , acumulando 32 mediciones. El aire ambiental fue tomado como *background* para los espectros.

- *Medidas espectrofotométricas de películas poliméricas.*

Los espectros UV Visibles de las películas modificadas y sin modificar, fueron adquiridos en un espectrofotómetro T60-U controlado por el software UVWIN 5 v 5.05. Para ello las películas fueron soportadas mediante cinta doble faz en el porta muestra del equipo y ubicadas en el paso óptico de la fuente de luz. Los espectros se registraron en varios puntos de la película, en el rango de 250- 350 nm.

- *Determinación del ángulo de contacto.*

Las medidas de humectabilidad o ángulo de contacto (WCA), se llevaron a cabo utilizando el método de la gota sésil, colocando un volumen de aproximadamente  $5\ \mu\text{L}$  de agua sobre la superficie polimérica de interés. Los ángulos fueron determinados antes y después de la modificación de BOPP. Se utilizó un microscopio óptico con cámara acoplada para captura de imágenes y el cálculo de los valores de dichos ángulos se llevó a cabo con el software *ImageJ 1.40g*. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

- *Medida de la transparencia de películas modificadas por injerto.*

El procedimiento aplicado para determinar la transparencia de las películas injertadas con AA, se basó en el método ASTM D 1746 – 03 “Standard Test Method for Transparency of Plastic Sheeting”, el cual es utilizado para determinar la transparencia de hojas plásticas incoloras o traslúcidas, en términos de su transmitancia regular (%T).

En este trabajo, la transmitancia de las películas modificadas fue comparada con la transmitancia regular de una película de BOPP comercial sin modificar. Para esto se determinó el área bajo la curva, integrando el espectro de transmitancia obtenido en el rango visible (400-800 nm) para cada película de BOPP-g-AA y para las películas de BOPP comercial sin injerto.

### **2.3.3 Incorporación del agente antifúngico NAT.**

- *Inmovilización física de NAT en películas BOPP-g-AA.*

La unión de la natamicina a las superficies injertadas se realizó sumergiendo a las películas de BOPP-g-AA en una solución acuosa del antifúngico (24 µg/mL) a pH 8,0, conseguida mediante la adición de una solución buffer fosfato. Luego de 24 horas sumergidas, las películas fueron removidas y lavadas con solución buffer. Posteriormente las superficies obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente hasta peso constante.

- *Inmovilización covalente de NAT en películas previamente injertadas.*

En un balón se colocó 5 mL de DMF; 8,8 mg de DCC (agente acoplante) y la película de BOPP-g-AA de 16 cm<sup>2</sup> de área; esta mezcla permaneció en agitación por 30 minutos a una temperatura de 35°C. Posteriormente, se añadió al balón de reacción 0,0216 g de NAT y se dejó en agitación por 12 hs a 35°C. Transcurrido este tiempo, las películas fueron retiradas, lavadas exhaustivamente en el solvente de reacción y luego enjuagadas vigorosamente con acetona y agua destilada. La película de BOPP-g-AA utilizada, fue pesada y caracterizada por espectroscopia FT IR – ATR y espectrofotometría UV-Visible, antes y después de efectuar la reacción de acoplamiento de NAT.

- *Recubrimiento de películas de BOPP con mezcla de resina polimérica y NAT.*

#### *Películas BOPP/RA: NAT.*

La obtención de las películas BOPP/RA: NAT se llevó a cabo cubriendo la superficie de películas de BOPP comercial, con una mezcla conformada por polimetacrilato de metilo y NAT. Esta mezcla (RA:NAT) se obtuvo agregando una masa conocida del agente antifúngico a una suspensión homogénea de polimetacrilato de metilo en acetato de etilo. Posteriormente, con un pulverizador se aplicó dicha suspensión sobre la película plástica e



inmediatamente después se utilizó un rodillo de goma espuma para terminar de extender homogéneamente el recubrimiento. Las películas recubiertas se dejaron secar a temperatura ambiente hasta peso constante. El espesor de las mismas fue determinado con un micrómetro Schwyz modelo ESP1-0001PLA.

#### **2.3.4. Determinación de NAT en películas activas.**

##### *○ Cuantificación de NAT unida a películas de BOPP-g-AA.*

La metodología consistió en extraer la NAT unida a la superficie de las películas y luego determinar la concentración de NAT en el solvente utilizado en dicha extracción. Primero se optimizaron las condiciones relacionadas al tiempo de extracción y al solvente utilizado. Esta optimización se hizo a través del estudio del porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de NAT.

Habiendo establecido las condiciones óptimas para cuantificar la NAT unida a superficies de BOPP-g-AA, a continuación se estudió la capacidad de carga del antifúngico por parte de películas con diferentes porcentajes de injerto.

##### *• Desarrollo y optimización de la metodología analítica.*

Se distribuyó un volumen de 150  $\mu$ L de una solución de NAT (20  $\mu$ g/mL; pH =8) sobre la superficie modificada de una película BOPP-g-AA. Las pruebas se realizaron en películas con dos grados de modificación diferentes: 0,5 %G y 7 %G. Posteriormente las películas fueron colocadas en estufa a 45°C hasta desaparecer las gotas depositadas.

Para llevar a cabo la extracción de la NAT unida a las películas BOPP-g-AA, se colocaron superficies de 3 x 5 cm<sup>2</sup> de área de dichas películas, en frascos de penicilina rotulados conteniendo 10,0 mL del solvente de extracción. Como solventes de prueba para la extracción del compuesto, se utilizaron agua destilada y una mezcla de metanol: ácido acético (MeOH: Ac), 95:5; El proceso de extracción se realizó al abrigo de la luz, a una temperatura de 8°C y con agitación constante.

En diferentes intervalos de tiempo, se tomó una alícuota del solvente de extracción de cada uno de los frascos y se analizó por espectrofotometría UV- Visible en el rango de

250- 350 nm (Los respectivos controles también fueron incluidos en este procedimiento). El porcentaje de recuperación fue estimado al comparar la cantidad de NAT cuantificada por espectrofotometría UV- Visible, con la cantidad teórica de compuesto depositada inicialmente en la superficie de la película.

- Cuantificación de NAT en películas BOPP-*g*-AA con diferentes %G

Primero se inmovilizó físicamente el antifúngico en películas BOPP-*g*-AA con porcentajes de injerto de diferentes (0,5; 2,5; 4,5; 7; 12; 15 y 20 %G). Luego se sometió a cada una de las películas resultantes (BOPP-*g*-AA + NAT) a una extracción con MeOH: Ac (95:5) por un periodo de 5 hs a 8°C y sin acceso de la luz (Estas condiciones fueron previamente establecidas como las más adecuadas para la extracción de la NAT). Posteriormente se midió la absorbancia del solvente de extracción a una longitud de onda de 319,4 nm. La concentración de NAT fue determinada a través de la curva de calibración correspondiente. La cantidad de antifúngico presente en la superficie injertada, se calculó teniendo en cuenta el valor de concentración obtenido y el porcentaje de recuperación de la técnica.

- Cuantificación de NAT presente en coating de películas activas BOPP/RA: NAT.

Para cuantificar la NAT presente en el *coating* adherido al BOPP, se cortó la totalidad de la película de interés en cuadrados de 0,5 cm de lado y se los colocó en un frasco de penicilina con 4,0 mL de ácido acético glacial en agitación moderada. A modo de control, se colocó en otro recipiente y en exactamente las mismas condiciones, una película de iguales características pero sin NAT en la formulación del *coating* (BOPP/RA). Luego de 5 hs, se recuperó el sobrenadante y se lo filtró con una membrana de nylon de 0,45 µm. A continuación se analizó el solvente filtrado mediante espectrofotometría UV-Visible en el rango de 250- 350 nm. La cantidad de NAT fue calculada a partir del valor de absorbancia obtenido a 319,4 nm y de la curva de calibración correspondiente.

### **2.3.5. Migración de NAT en agua. Liberación del agente antifúngico de películas BOPP-g-AA + NAT y BOPP/RA + NAT en agua.**

La migración de NAT de las películas BOPP-g-AA +NAT y BOPP/RA:NAT en agua, se realizó en ambos casos, colocando las películas (15 cm<sup>2</sup> de área) en contacto con un volumen conocido de agua destilada a temperatura ambiente. Durante la prueba de migración, se prestó especial atención a que la superficie de la película conteniendo NAT, permaneciera en contacto con el solvente. Además, los recipientes utilizados fueron recubiertos con papel aluminio para prevenir la descomposición de la NAT por acción de la luz. Como muestras control, se testearon películas injertadas y/o recubiertas sin NAT y una solución de concentración conocida del analito preparada y almacenada en las mismas condiciones.

En diferentes periodos de tiempo, se tomó una alícuota de 3 mL de cada solución en contacto con las películas y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 319,4 nm. Después de cada una de las mediciones, la alícuota fue devuelta a la solución madre. El cálculo de la concentración de NAT en el agua destilada, se realizó a partir de la relación entre el valor de absorbancia medido y la curva de calibración correspondiente.

### **2.3.6. Pruebas microbiológicas**

- Preparación de inóculo de mohos o levaduras.

Se prepararon sendos inóculos de *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus niger* recuperados en agar mohos y levaduras, provenientes de la colección de microorganismos del Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP) y del Laboratorio de Bromatología del Departamento de Bioquímica Clínica de la FCQ, respectivamente. Se preparó una suspensión madre de cada uno de los mencionados microorganismos en buffer fosfato de dilución estéril, con una concentración comprendida entre  $10^4 - 10^6$  UFC/mL, a partir de la cual se realizaron las correspondientes diluciones decimales seriadas.

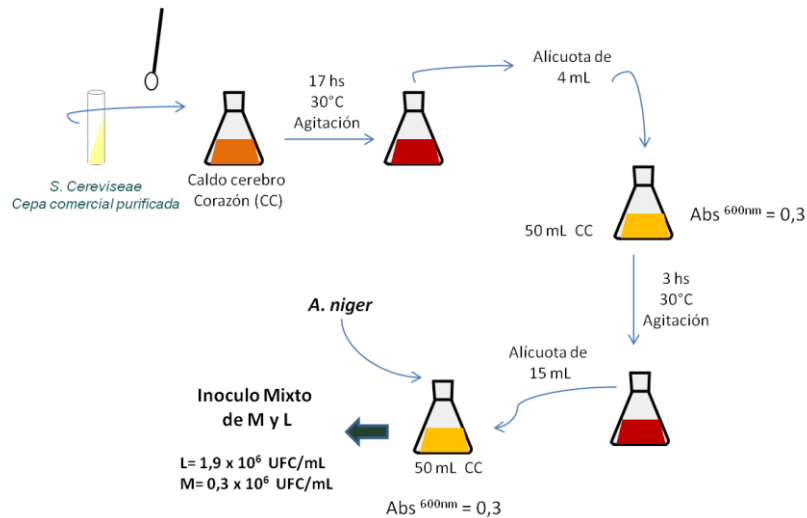
○ Preparación de inóculo mixto de mohos y levaduras

El inóculo mixto de *S. cerevisiae* y *A. niger*, se preparó adaptando la metodología propuesta por Martorell *et al.* basada en la estimación de la carga microbiana presente en un medio líquido YPD (2% glucosa, 1% extracto de levadura y 2% peptona) a través de la medición de la densidad óptica a 600 nm (Lante *et al.* 2011; Martorell *et al.* 2011).

En el presente trabajo, se inoculó un volumen de 50 mL de caldo cerebro corazón estéril, con levaduras extraídas de un repique conservado a una temperatura de  $5\pm 1$  °C. A la suspensión resultante se la mantuvo en agitación a 30°C y por un periodo de 17 hs. Luego se transfirió una alícuota de 4 mL de esta suspensión a 50 mL de caldo cerebro corazón, para entonces medir su densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. Se ajustó el valor de absorbancia de la suspensión entre 0,3 y 0,35 unidades. Seguidamente se dejó en agitación el caldo de cultivo a 30°C por 3 hs. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 15 mL de la suspensión y se la adicionó a un erlenmeyer conteniendo 50 mL de caldo nutritivo; después de homogeneizar, se ajustó la absorbancia entre 0,3 y 0,35 unidades. Este procedimiento permitió hacer crecer las levaduras hasta la etapa exponencial y por lo tanto obtener un inóculo fresco de estos microorganismos, con una concentración promedio de  $1,9 \times 10^6$  UFC/mL.

La incorporación de *A. niger* al inóculo de *S. cerevisiae*, se efectuó posteriormente a la última resuspensión de levaduras en caldo cerebro corazón y se llevó a cabo a través del hisopado de la superficie de un medio de cultivo sólido (M y L) conteniendo las colonias fructificadas de *A. niger*. La carga arrastrada por el hisopo, se resuspendió en el caldo de cultivo con las levaduras en la etapa exponencial y se homogeneizó vigorosamente hasta obtener finalmente una suspensión homogénea.

En la Figura 2.3.6., se muestran ilustrativamente los pasos realizados en la preparación del inóculo mixto.



**Figura 2.3.6.** Preparación de inóculo mixto de mohos y levaduras (M y L) en fase exponencial.

○ Ensayos microbiológicos en medio de cultivo. Ensayos de difusión en placa

Sobre placas de Petri, conteniendo medio de cultivo agar para mohos y levaduras estéril, se rastrilló un inóculo (0,2- 0,4 mL) de levaduras y/o mohos suspendidos en buffer fosfato estéril. Sobre este inóculo se colocaron discos de las películas a testear, de un diámetro aproximado de 1,5 cm, con el lado de interés en contacto con el agar. Las placas fueron incubadas en estufa a  $37 \pm 1$  °C, por un periodo de entre 24 y 48 hs. Pruebas preliminares permitieron establecer a estas condiciones como las más adecuadas para obtener una lectura estable y confiable del crecimiento de los microorganismos.

○ Ensayos microbiológicos en quesos

● Técnica de hisopado de la superficie del alimento.

La carga fúngica en la superficie del queso, fue arrastrada cuidadosamente utilizando un hisopo estéril embebido en buffer fosfato. Este procedimiento se repitió utilizando un segundo hisopo sin embeber y realizando el arrastre en sentido perpendicular al efectuado en el paso anterior. Ambos hisopos inmediatamente después de ser utilizados, fueron sumergidos conjuntamente en 5,0 mL de buffer fosfato estéril y agitados vigorosamente para arrastrar a la fase líquida la carga adherida de microorganismos. El inóculo resultante, se homogenizó por agitación en vórtex para

obtener una suspensión uniforme. Para cada suspensión, se realizaron las diluciones seriadas correspondientes, de las cuales se tomó un volumen conocido y se sembró por rastrillado en una placa conteniendo agar para mohos y levaduras. Las placas fueron incubadas a 37° C por un periodo de 24 a 48 hs y posteriormente se efectuó el recuento de las colonias presentes.

- *Estudio de la distribución de colonias en superficie de queso.*

El estudio de la carga fúngica superficial de quesos, se realizó mediante la técnica de hisopado descrita en el punto anterior. Las superficies de los alimentos analizados correspondieron a queso de elevada humedad.

Para conocer la distribución precisa de mohos y levaduras en la superficie del queso seleccionado en este trabajo de Tesis, una porción del mismo (23 x 8 cm<sup>2</sup> y 1 cm de espesor), fue dividida en ocho sectores de 24 cm<sup>2</sup> cada uno y analizado cuantitativamente mediante la técnica de hisopado. De esta manera, se realizó el recuento de colonias pertenecientes a cada sector de la porción de queso analizada.

- *Homogenización de carga microbiana: contaminación de la superficie de queso.*

Para obtener una distribución regular de mohos y levaduras en la porción de queso a ensayar, se contaminó a la superficie de la misma con un inóculo fresco de *S. cerevisiae* y *A. niger* en condiciones controladas. Para esto, se depositaron sobre la superficie del mismo, tres alícuotas cada una de 250 µL del inóculo mixto y se distribuyeron homogéneamente con espátula de Drygalsky hasta absorberse el líquido en la superficie del alimento. Por último se dejó orear a las superficies del queso en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente.

- *Ensayo de efectividad antimicrobiana de las películas activas.*

Se cortó una cantidad de porciones de queso de (23 x 6 cm<sup>2</sup> y 1 cm de espesor) equivalente al número de ensayos previstos durante el periodo de almacenamiento (21 días) (Figura 2.3.7.). Luego, cada una de las porciones fue contaminada intencionalmente con un inóculo mixto de mohos y levaduras (0,3. 10<sup>6</sup> UFC/mL y 1,9 .10<sup>6</sup> UFC/mL respectivamente) según la metodología descrita anteriormente.



**Figura 2.3.7.** Porciones de queso para ensayo de efectividad antifúngica en queso y disposición de las películas a testear en contacto con la superficie del alimento.

Sobre la superficie de queso contaminada, se pusieron en contacto películas activas, películas de BOPP comercial sin modificar y también se dejó espacios vacantes a modo de control. Las superficies poliméricas fueron cuadradas, de 4 cm de lado y con el lado activo en íntimo contacto con el alimento (Figura 2.3.7). Posteriormente las muestras de queso fueron envueltas en papel *film* de cocina para evitar la pérdida de humedad y la contaminación cruzada. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado y las mismas fueron almacenadas por 21 días a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 40% de humedad relativa.

A intervalos de tiempo preestablecidos dentro del periodo de almacenamiento, se determinó mediante el hisopado cuantitativo, el número de mohos y levaduras presentes en la superficie del alimento en contacto con las películas activas, películas de BOPP comercial, de los espacios vacantes (CONTROL) y/o de zonas pintadas directamente con una suspensión de NAT (300 mg/L).

### **2.3.7. Determinación del contenido de NAT en superficie de queso: ISO 9233-1:2007 (IDF 140-2: 2007)**

La cuantificación de NAT en muestras de queso que estuvieron en contacto con las películas activas, se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la norma internacional ISO 9233-1:2007 (IDF 140-2: 2007). Este método es apto para determinar la migración de

natamicina al interior del alimento y controlar los límites de tolerancia de dicho compuesto en cáscaras de quesos y sectores adyacentes.

La metodología consistió en colocar las muestras de queso de aproximadamente 10 g y 5 mm de espesor, en un Erlenmeyer con 100 mL de MeOH en agitación por 90 minutos. Trascurrido este tiempo, se añadió 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se colocó en *freezer* por 60 minutos. Posteriormente se filtró el extracto, cuidando que la temperatura no se incremente y así evitar la disolución de grasa precipitada; luego una alícuota de 5 mL se filtró nuevamente con una membrana de nylon de 0,22 µm de tamaño de poro. Por último se registró el espectro UV-Visible de la solución obtenida, en el rango de 300- 350 nm, determinando el valor de absorbancia a 319,4 nm. Como blanco se utilizó una mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1). La concentración de NAT en la solución final fue determinada a través del valor de absorbancia medido y de la curva de calibración correspondiente; de ese modo se calculó la masa de NAT expresada en mg, presente en la muestra de queso y se la relacionó con el peso de la muestra expresada en Kg, o con el área de la porción expresada en dm<sup>2</sup>.

Para evaluar la eficiencia de extracción y cuantificación de NAT por el uso de esta técnica, se procesó una muestra control de queso con una cantidad conocida del agente antifúngico. En este ensayo el porcentaje de recuperación de la NAT fue del 93,75%.



## **Capítulo 3: Resultados y discusión**



### **3.1 Modificación superficial de materiales poliméricos: Injerto de AA en películas comerciales de BOPP.**

*La superficie de un polímero, es la principal partícipe en todas las interacciones físicas y químicas que el material mantiene con su entorno. Por esta razón y debido a la naturaleza hidrofóbica e inercia química de la mayoría de los materiales poliméricos, es que a los fines de conseguir una aplicación determinada, generalmente es necesario realizar modificaciones a nivel superficial. En este trabajo de Tesis, se efectuaron una serie de actividades relacionadas a la modificación superficial de películas plásticas de BOPP de uso comercial, a través del injerto de AA. A continuación, se exponen los resultados obtenidos en cuanto al uso de métodos de alta energía (descarga corona y tratamiento plasma) para llevar adelante estas modificaciones. Como así también en cuanto a la optimización de la técnica de fotoinjerto de AA llevada a cabo con el mismo propósito.*



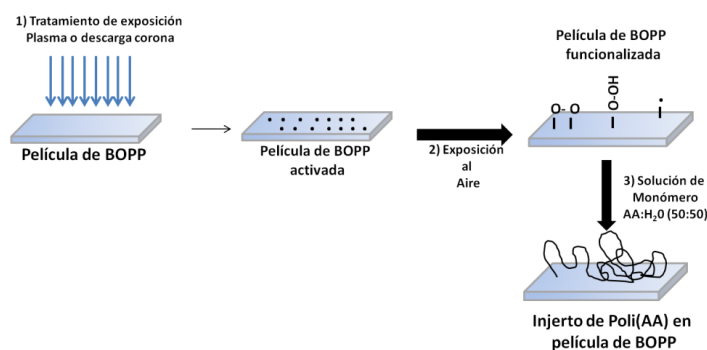
### 3.1.1 Injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante previa activación a través de tratamiento plasma o descarga corona

Se estudió la posibilidad de llevar a cabo el injerto de AA en películas de BOPP, mediante el uso individual de fuentes de alta energía, como son la descarga corona y la radiación plasma. La metodología general adoptada para llevar a cabo el proceso de injerto mediante estas técnicas, fue la de “*injerto secuencial*” o de “*pre-irradiación*” (Bhattacharya 2004; Gupta, Krishnanand, and Deopura 2012).

Esta metodología involucra dos etapas independientes: La primera, consiste en efectuar la activación o pre-irradiación de las películas de BOPP, mediante su exposición al plasma o la descarga corona. En esta etapa se generan en la superficie del material, radicales libres que pueden ser oxidados por acción del oxígeno atmosférico, convirtiéndose en grupos reactivos como ser, peróxidos, hidroperóxidos, etc.

La segunda etapa, implica colocar a la película previamente activada, en contacto con el monómero a injertar (en nuestro caso, AA). En esta etapa y en las condiciones adecuadas, las especies reactivas generadas en primera instancia, son capaces de iniciar el proceso de polimerización y consecuentemente el injerto de AA sobre la superficie.

Para finalizar, los residuos de homopolímero y monómero libres, son removidos de la superficie a través de sucesivos lavados. En la Figura 3.1.1, se muestra representativamente el proceso global de este tipo de modificaciones.



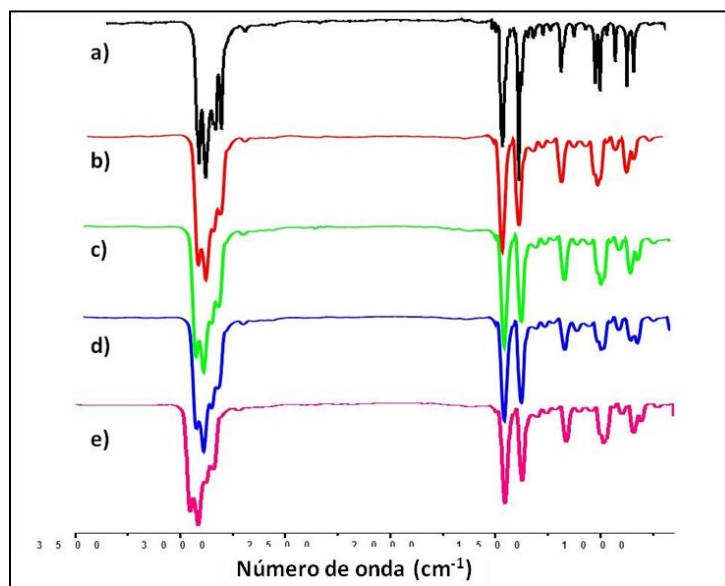
**Figura 3.1.1.** Injerto secuencial mediante activación plasma o descarga corona.

La exposición de las películas de BOPP al plasma, fue llevada a cabo en un equipo de escala industrial, comúnmente utilizado para incrementar la hidrofiliidad de

superficies de BOPP y facilitar así la adhesión de tintas. También es empleado para eliminar residuos orgánicos y para la deposición de aluminio sobre películas de este mismo material. Para efectuar las reacciones de injerto, se variaron los parámetros de equipo correspondientes a la velocidad de tránsito de la película polimérica y a la relación de Ar/O<sub>2</sub> en la mezcla de gases del plasma, propiamente dicho (Tabla 3.1.1). Luego de ser tratadas las películas, estas fueron expuestas al oxígeno atmosférico por un periodo aproximado de 5 minutos y posteriormente colocadas 12 hs en contacto con una solución de AA al 50% (BOPP+ Plasma + AA). A continuación, las mismas fueron exhaustivamente enjuagadas. En la Figura 3.1.2 se muestra los espectros FT IR- ATR obtenidos para las películas ensayadas en estas condiciones.

Película	Potencia	Velocidad de tránsito de película	Ar: O <sub>2</sub>	
	(KW)	(m/min)		
BOPP	+ plasma - 1)	0,1	400	80:20
	+ plasma - 2)	0,1	200	80:20
	+ plasma - 3)	0,1	400	99:1
	+ plasma - 4)	0,1	200	99:1

**Tabla 3.1.1.** Condiciones de equipo para el tratamiento plasma de las películas de BOPP.

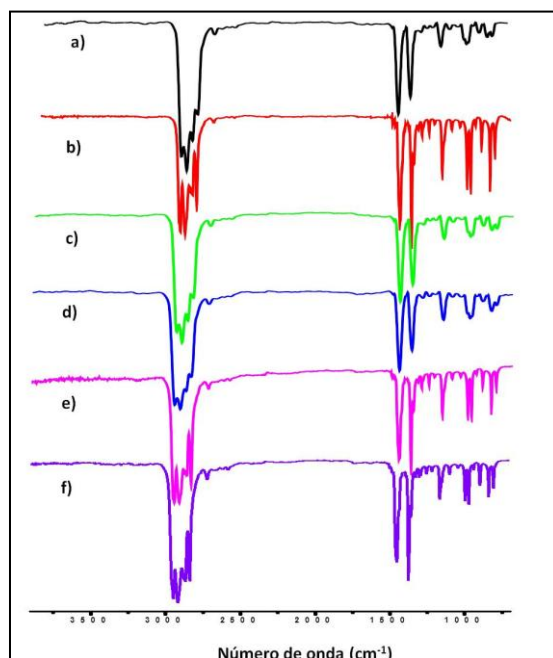


**Figura 3.1.2.** Espectros FT IR- ATR de películas de BOPP tratadas por plasma: a) BOPP + Plasma; b) BOPP + Plasma -1 + AA; c) BOPP+ Plasma -2 + AA; d) BOPP+ Plasma -3 + AA; e) BOPP+ Plasma -4 + AA.

La activación de las películas mediante descarga corona, también fue llevada a cabo en un equipo de escala industrial. En este caso, el estudio del injerto sobre la superficie del polímero, se efectuó modificando la potencia de descarga del equipo y el tiempo de exposición al oxígeno atmosférico de las películas pre-activadas. En la tabla 3.1.2 se resumen las condiciones utilizadas en estos ensayos y en la Figura 3.1.3, se muestran los espectros FT IR- ATR de dichas superficies luego de estar en contacto con la solución de AA (BOPP + Corona + AA).

Película	Potencia (KW)	Velocidad de tránsito de película (m/min)	Tiempo de exposición al oxígeno atmosférico
BOPP + Corona -1)	2,8	30	5 min
+ Corona -2)	2,8	30	5 seg
+ Corona -3)	3,5	30	5 min
+ Corona -4)	3,5	30	5 seg

**Tabla 3.1.2.** Condiciones de equipo para la activación por descarga corona de las películas de BOPP.



**Figura 3.1.3.** Espectros FT IR-ATR de películas de BOPP tratadas por descarga corona y puestas en contacto con solución de AA: a) BOPP + Corona – 1 + AA; b) BOPP+ Corona – 2 + AA; c) BOPP+ Corona – 3 + AA; d) BOPP+ Corona – 4 + AA; e) BOPP+ Corona (exposición al oxígeno de 5 min); f) BOPP+ Corona (exposición al oxígeno de 5 seg).

El análisis de los espectros ATR obtenidos para las películas tratadas por ambas metodologías (tratamiento plasma y descarga corona), sugiere que en las condiciones ensayadas, el injerto de AA en las películas de BOPP no se llevó a cabo de manera satisfactoria. En el conjunto de espectros (Figuras 3.1.2 y Figura 3.1.3), no se evidencia la presencia de bandas adicionales a las del polipropileno, correspondientes a poliAA (Bandas a  $1700\text{ cm}^{-1}$  y/o  $1550\text{ cm}^{-1}$ ). Por esta metodología, tampoco se apreciaron diferencias en las muestras tratadas por descarga corona y expuestas por diferentes lapsos de tiempo al oxígeno atmosférico (Figura 3.1.3, espectros e y f).

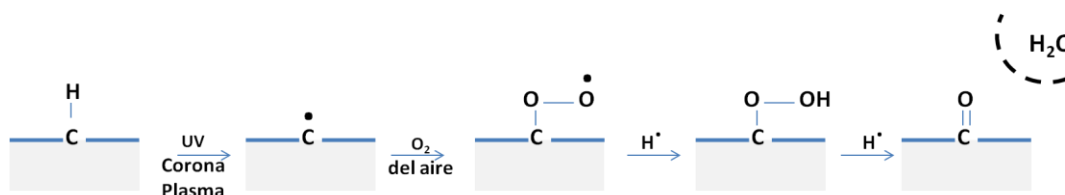
El tratamiento de películas poliméricas, mediante las técnicas de descarga corona o plasma, es uno de los recursos más utilizados en la industria del plástico, para conseguir propiedades que por lo general son ajenas a los materiales destinados a envases. Con estas técnicas, también es posible la incorporación de grupos funcionales a través de la copolimerización de determinados monómeros vinílicos. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de Tesis, sin embargo, indican que en las condiciones ensayadas, no fue posible llevar a cabo el injerto del monómero AA en las películas de BOPP previamente activadas por plasma o descarga corona. Esto posiblemente fue debido a las limitaciones de los equipos industriales utilizados en esta experiencia (Figura 3.1.6 y 3.1.7), cuyos márgenes de variación en cuanto a la velocidad de tránsito, potencia, distancia entre el sustrato y la fuente de energía y la atmósfera reactiva, fueron muy bajos, pudiendo así afectar el rendimiento de las reacciones de injerto.

Se estima que el tiempo de exposición de las películas plásticas a las distintas fuentes de energía, no fue el suficiente para que en las condiciones ensayadas se genere la cantidad adecuada de sitios reactivos. El tiempo de tratamiento promedio de las películas poliméricas, fue aproximadamente de 0,6 seg para descarga corona y 0,03 seg para tratamiento plasma. Estos valores de tiempo, comparados con los informados en trabajos similares (Lei and Liao 2001; Sciaratta et al. 2003; Sun et al. 2010; Wang and Chen 2007) son en algunos casos, dos órdenes de magnitud menor.



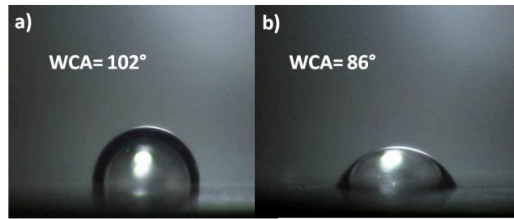
Dos aspectos muy importantes en estos procesos de activación y posterior funcionalización de las superficies son: i) el periodo que transcurre luego de la activación y ii) las condiciones de almacenamiento de la película activada.

Los sitios activos formados en el polímero por su exposición a la descarga corona o al tratamiento plasma, son los precursores en el proceso de copolimerización. Estos pueden tener tiempos de vida de hasta 15 días en condiciones de vacío y baja temperatura ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). Sin embargo, a temperaturas cercanas a los  $30^{\circ}\text{C}$  y en atmósferas con presencia de oxígeno, rápidamente ocurre el movimiento de las cadenas del polímero tratado y la reacción con especies activadas de la atmósfera ( $\text{O}$ ,  $\text{O}_2^*$ ,  $\text{O}_3$ ). Esto facilita en poco tiempo la descomposición y desactivación de estos sitios, resultando en su mayoría, dobles enlaces entre las cadenas del polímero y especies oxidadas estables que son incapaces de iniciar el proceso de polimerización (Figura 3.1.4). (Bhattacharya 2004; Gupta, Krishnanand, and Deopura 2012)



**Figura 3.1.4.** Mecanismo de formación de radicales libres y posterior oxidación por exposición a fuentes de energía externas.

La presencia de estas especies polares, resultado de la oxidación de la superficie, fue comprobada a través de mediciones del ángulo de contacto del agua (WCA) en una película de BOPP tratada por radiación plasma. En la Figura 3.1.5 se puede observar que en comparación a la película sin tratamiento, la superficie tratada mostró un descenso en el valor de WCA medido, producto de su mayor carácter hidrofílico. Esta característica, es la deseada por las industrias que procesan esta clase de materiales, para la aplicación de tintas, recubrimientos, mejorar la adhesión, etc.



**Figura 3.1.5.** WCA de a) BOPP sin tratamiento corona b) BOPP con tratamiento corona.

La probable homopolimerización del monómero, en la segunda etapa del proceso, es otro de los factores responsables de la inhibición de la reacción de injerto. Este fenómeno tiene como consecuencia un aumento en la viscosidad del medio, junto con una disminución en la movilidad de las cadenas a injertar; por lo tanto, hay una disminución en la velocidad de reacción de copolimerización. Esto se presenta generalmente a temperatura ambiente en las soluciones de monómero, donde la movilidad de las cadenas reactivas es baja (Lei & Liao, 2001; Wang & Chen, 2007).



**Figura 3.1.6.** Equipo de tratamiento plasma utilizado.

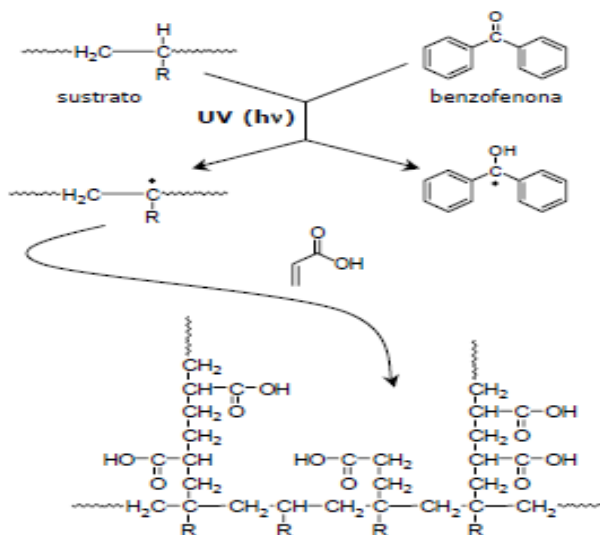


**Figura 3.1.7.** Equipo de tratamiento por descarga corona utilizado.

### 3.1.2 Injerto de AA en películas comerciales de BOPP, mediante reacción asistida por radiación UV: reacción de fotoinjerto.

#### Fotoinjerto de AA mediante solución reactiva de monómero y fotoiniciador.

Las reacciones de injerto fueron realizadas en un sistema constituido por el sustrato polimérico en forma de película (BOPP) puesto en contacto con una solución del monómero (AA) y fotoiniciador (BF). Este sistema fue irradiado con luz UV de 254 nm, la cual es usada como fuente de energía para llevar a cabo la reacción. Esta radiación logra los estados excitados de la molécula de BF, capaces de iniciar la reacción de copolimerización entre el AA y el sustrato (J Deng et al. 2009; Ranby, Yang, and Tretinnikov 1999). La Figura 3.1.8 muestra el esquema general para la reacción de fotoinjerto de AA en superficies de PP. Cabe destacar que en dicho proceso, es posible que ocurran reacciones secundarias, como ser degradación de la matriz polimérica, reacciones de entrecruzamiento, oxidaciones, homopolimerización, entre otras (Costamagna 2006).



**Figura 3.1.8** Esquema de reacción de fotoinjerto de AA en BOPP (Costamagna 2006)

Las variables modificadas para llevar a cabo la optimización de las reacciones de injerto, fueron:

- *Hidrofilicidad de la superficie de BOPP a injertar*: En este caso, se evaluó el injerto de AA en superficies previamente tratadas con descarga corona y en superficies sin tratamiento previo (de menor hidrofilicidad que las anteriores).
- *Distancia entre el sustrato y la fuente de luz UV*: El fotorreactor, provisto de una bandeja móvil (Figura 2.3.3), brindó la posibilidad de estudiar los efectos de la separación existente entre la fuente de radiación UV (lámpara de mercurio) y el sustrato polimérico. Para esto se estudiaron separaciones de 6, 12, 22 y 28 cm.
- *Concentración de BF en la solución reactiva*: Se varió la concentración de fotoiniciador presente en la solución reactiva de monómero. En la tabla 3.1.3 se indican los valores de concentración de BF estudiados.
- *Tiempo de radiación UV o tiempo de reacción*: Se evaluó el rango de tiempo de exposición UV que fuese necesario para conseguir la modificación deseada en las películas de BOPP.

Antes de ser analizados, todos los productos obtenidos fueron exhaustivamente lavados para remover posibles restos de homopolímero y reactivos.

Para evaluar el grado de modificación o “grafting” de las superficies tratadas, se empleó el parámetro de “porcentaje de injerto” (%G). Dicha magnitud es determinada gravimétricamente y corresponde a la siguiente ecuación:

$$\%G = \frac{m(\text{BOPP} - g - \text{AA}) - m(\text{BOPP})}{m(\text{BOPP})} \times 100$$

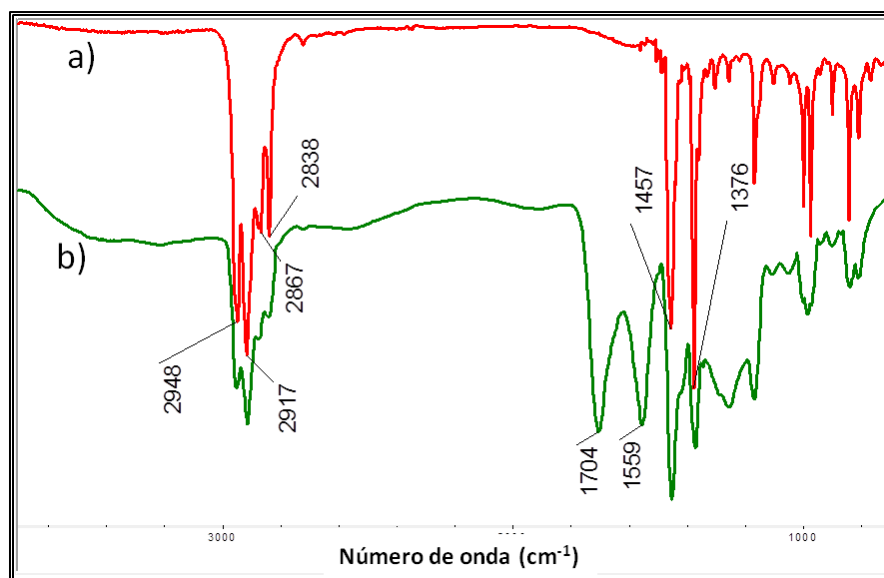
Donde  $m(\text{BOPP}-g-\text{AA})$  corresponde a la masa del co-polímero de injerto ó sustrato modificado y  $m(\text{BOPP})$  a la masa de sustrato sin modificar.

Otra de las metodologías utilizadas para determinar el grado de injerto de las superficies, fue la cuantificación de grupos ácidos (COOH) provenientes del poliAA injertado. Esto se llevó a cabo mediante la titulación ácido base de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de las películas modificadas.

La caracterización química de las superficies, fue realizada por espectroscopia FT IR- ATR. En la Figura 3.1.9, se puede observar el espectro de una superficie de BOPP sin

tratamiento (espectro a) y otro del mismo material injertado con AA (espectro b). En el espectro a), se realizó la siguiente asignación de bandas, típicas del polipropileno:

- Bandas a  $1457\text{ cm}^{-1}$  y  $1376\text{ cm}^{-1}$ : vibraciones de flexión de  $\text{CH}_3$ .
- Bandas a  $2838\text{ cm}^{-1}$  y  $2917\text{ cm}^{-1}$  vibraciones de tensión de  $\text{CH}_2$ .
- Bandas a  $2948\text{ cm}^{-1}$  y  $2867\text{ cm}^{-1}$ : vibraciones de tensión de  $\text{CH}_3$ .



**Figura 3.1.9.** Espectro FT IR de: a) BOPP sin modificar y b) BOPP- g- AA.

En el espectro de la superficie de BOPP injertada con AA (espectro b), a diferencia del espectro del sustrato, se observa una banda intensa a  $1704\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del enlace  $\text{C}=\text{O}$  de  $-\text{COOH}$  y otra banda a  $1559\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de tensión de grupo  $-\text{COO}^-$ . Ambas, características del poliAA injertado.

El grado de hidrofiliicidad/ hidrofobicidad de las películas injertadas, fue estimado mediante la medición del ángulo de contacto de gota de agua (WCA). Esto es una medida de la “mojabilidad” de la superficie, es decir, de la capacidad para generar interfaces entre la película y en este caso, agua. Esta característica es determinante en vista de una dada aplicación tecnológica, por ejemplo en la fijación de tintas, recubrimientos o la inmovilización de moléculas bioactivas.

Por último se evaluó el efecto del injerto sobre la transparencia de las películas modificadas. Para este fin se siguieron los lineamientos de la norma ASTM “Standard Test

Method for Transparency of Plastic Sheetings" (ASTM D1746 2003), la cual permite llevar a cabo determinaciones de transparencia de hojas plásticas incoloras en término de su transmitancia (%T).

Con el uso combinado de estas técnicas de caracterización, se conoció el comportamiento de cada una de las variables estudiadas, en relación a la modificación de las películas de BOPP. De este modo y teniendo en cuenta el objetivo concreto del trabajo, se establecieron las condiciones óptimas del sistema para llevar a cabo las reacciones de injerto.

A continuación se muestran los resultados para cada una de las variables modificadas en el sistema:

- *Hidrofilicidad previa de la superficie de BOPP a injertar.*

Se observó que el injerto en las superficies de BOPP con previo tratamiento corona (42 dyn/cm<sup>2</sup>), se llevó a cabo de manera homogénea en la totalidad de la película. Por el contrario, en las superficies de BOPP sin previo tratamiento corona, la simple inspección visual de las mismas, permitió diferenciar zonas aisladas en donde el injerto fue efectivo (zonas levemente opacas) y zonas en las que no (zonas traslúcidas).

La diferencia en la homogeneidad del injerto, según el tratamiento previo de la película de BOPP, podría explicarse a través de la polaridad de las superficies y su consecuente interacción con la solución reactiva: aquellas películas con previa activación Corona, es decir, de mayor hidrofilicidad, permitieron que la solución reactiva (de carácter hidrofílico, debido al solvente y el monómero utilizados) se distribuya de manera homogénea al estar en contacto con la película. La interacción entre el monómero y las cadenas del polímero en estas superficies, se vio favorecida para llevar a cabo la reacción de injerto. Por el contrario, en las superficies sin previo tratamiento corona, es decir, de naturaleza predominantemente hidrofóbica, la solución reactiva se distribuyó de manera no homogénea y con una pobre interacción con las cadenas del polímero, favoreciendo probablemente la reacción de copolimerización únicamente en las zonas amorfas del mismo.

- *Separación entre el sustrato y la fuente de luz UV.*

En este punto se modificó la posición de la bandeja móvil del fotorreactor, a los fines de optimizar el parámetro de la separación entre la fuente de luz UV y sistema reactivo.

Para una separación de 6 cm entre la fuente de luz UV y el sistema reactivo, la energía radiante fue suficiente para dañar la superficie del polímero, observándose la deformación de las películas. Al evaluar una separación de 12 cm., se obtuvieron modificaciones homogéneas en la totalidad de las superficies tratadas. Y en las posiciones cuya separación fue de 22 cm y 28 cm, el injerto de las superficies fue heterogéneo y poco efectivo. Esto puede deberse a que la potencia radiante que incide en el sistema de reacción, se hace menor al aumentar la separación entre la fuente UV y el sustrato polimérico, lo cual favorece la modificación del polímero en las zonas amorfas.

Según estas observaciones, se eligió una separación de 12 cm entre la fuente de luz y el sistema reactivo, para llevar a cabo la modificación de las películas.

- *Concentración de BF en la solución reactiva.*

La velocidad de una reacción de injerto, es dependiente de la naturaleza del monómero, del sustrato polimérico y en gran medida de la concentración del iniciador (Bhattacharya 2004). La solubilidad, la concentración y el tipo de iniciador, son factores determinantes en el proceso de injerto de cualquier monómero. En la tabla 3.1.4 se muestran los valores de %G de las películas injertadas, habiendo utilizado diferentes concentraciones de BF.

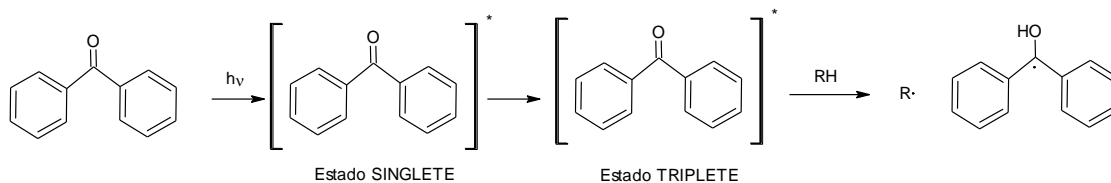
Sustrato	Tiempo de irradiación	Separación fuente UV/ sustrato	[BF]	%G
BOPP (Con previo tratamiento Corona)	7 min	12 cm	0,025 M	1,8
BOPP (Con previo tratamiento Corona)	7 min	12 cm	0,05 M	10,8
BOPP (Con previo tratamiento Corona)	7 min	12 cm	0,1 M	20,8
BOPP (Con previo tratamiento Corona)	7 min	12 cm	0,2 M	20,1

**Tabla 3.1.4.** Fotoinjerto de AA en BOPP variando la concentración de BF de la solución reactiva.

El aumento en el grado de modificación, junto con el de la concentración de BF, se debe a que al aumentar la cantidad de iniciador, se genera un mayor número de especies excitadas que son las responsables de dar inicio a la reacción de polimerización radicalaria (paso de iniciación); esto se traduce en una cinética elevada de la reacción de injerto. Por otra parte, por encima de una concentración límite de fotoiniciador, la abundancia de las especies excitadas, conduce a que estas también puedan participar en las reacciones de terminación de la cadena polimérica. Este es el caso del radical benzopinacol, BFH• (Figura 3.1.10), el cual en estos casos tiende a participar en el paso de terminación por acoplamiento (J Deng et al. 2009).

Para cada reacción de fotoinjerto, existe una concentración de iniciador por encima de la cual el grado de modificación disminuye o permanece invariable (Bhattacharya 2004; Mohamed et al. 2012). Según los valores de %G obtenidos para este sistema (tabla 3.1.4), concentraciones de BF superiores a 0,1 M, no generaron cambios significativos en el porcentaje de injerto de AA. Mientras que con el uso de concentraciones menores, se obtuvieron bajos grados de modificación y en algunos casos, heterogéneos. Es por esto que a los fines de obtener los mayores porcentajes de injerto, empleando el menor tiempo de exposición UV, para este sistema se escogió una concentración de iniciador 0,1 M.





**Figura 3.1.10.** Mecanismo de formación de las especies activas de la BF por acción de la luz UV.

- *Tiempo de irradiación.*

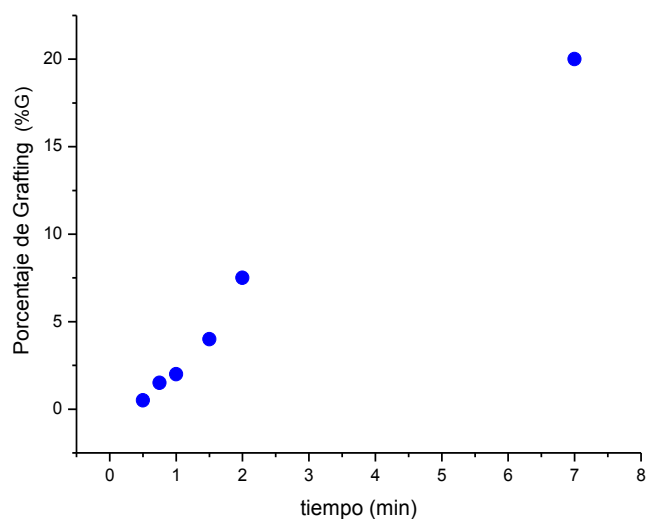
En la tabla 3.1.5 se muestran los valores de %G obtenidos para superficies de BOPP injertadas, utilizando diferentes tiempos de irradiación UV. También se exponen los moles de grupos ácidos (-COOH) presentes en la superficie, determinados por titulación volumétrica ácido- base.

Se observa un claro incremento del grado de modificación de las superficies, junto con el aumento del tiempo de radiación UV. Esta tendencia se muestra además en la Figura 3.1.11 y es coherente con la cuantificación de grupos -COOH injertados.

Sustrato	Tiempo de irradiación	% G	moles de grupos -COOH en superficie*	WCA (°)
BOPP	-	-	-	89,0° ± 0,6°
BOPP	30"	0,5	1,2 x 10 <sup>-4</sup>	75° ± 2°
BOPP	45"	1,5	2,2 x 10 <sup>-4</sup>	46° ± 0,6°
BOPP	1'	2	2,8 x 10 <sup>-4</sup>	39° ± 0,6°
BOPP	1' 30"	4	6,0 x 10 <sup>-4</sup>	NPD
BOPP	2'	7,5	6,9 x 10 <sup>-4</sup>	NPD
BOPP	7'	20	1,7 x 10 <sup>-3</sup>	NPD

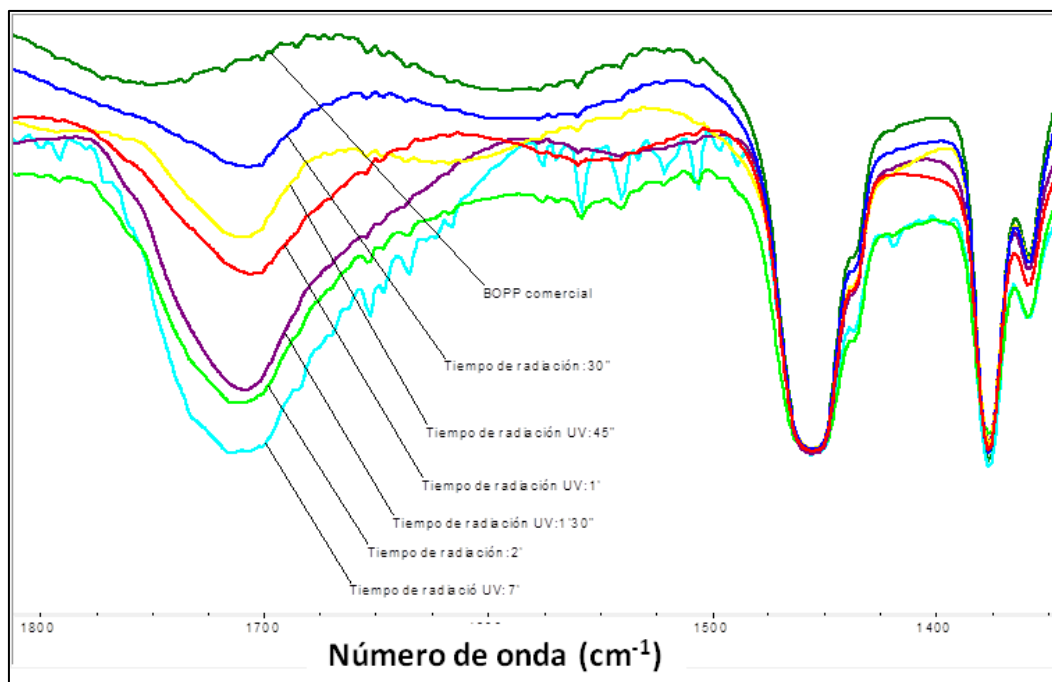
**Tabla 3.1.5.** Modificación de las películas BOPP-g-AA en función del tiempo de irradiación.

\*Moles determinados por titulación volumétrica en una superficie de 16 cm<sup>2</sup>. NPD= No fue posible determinar.



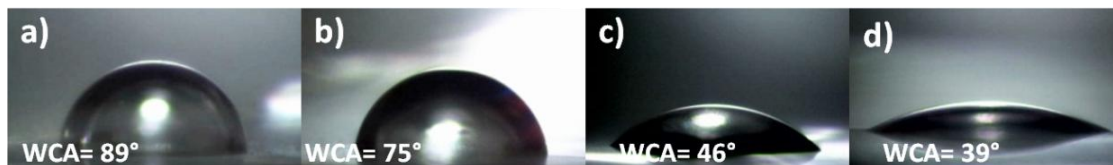
**Figura 3.1.11.** Porcentaje de modificación (%G) en función del tiempo de irradiación.

La caracterización por espectroscopia infrarroja, permitió establecer las diferencias entre las estructuras químicas de las superficies injertadas y los correspondientes sustratos. En la Figura 3.1.12 se presentan los espectros FT IR de transmisión de las superficies tratadas con diferentes tiempos de exposición UV. En la misma Figura, se incluye a modo de comparación el espectro de una película de BOPP sin modificar. En los espectros obtenidos, a medida que el tiempo de reacción o irradiación es mayor, se observa un incremento en la intensidad de la señal característica del poliAA (aproximadamente a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ), en relación a las bandas originales del polipropileno ( $1457\text{ cm}^{-1}$  y  $1376\text{ cm}^{-1}$ ). Esto corrobora que el grado de modificación de las películas tratadas, se hace más importante a medida que aumenta el tiempo de exposición UV.



**Figura 3.1.12.** Espectros IR de superficies injertadas con AA a diferentes tiempos de radiación UV. Intensidad relativa de la banda de vibración C=O ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ) relativa a la banda  $-\text{CH}_2$  ( $1457\text{ cm}^{-1}$ ) de PP.

Los cambios químicos y estructurales de las superficies injertadas también pueden ser representados por la medición del WCA. En líneas generales, esto permite definir el carácter hidrófilo/ hidrófobo de las superficies modificadas. En la tabla 3.1.5 y en la Figura 3.1.13 se observa un marcado descenso del WCA, junto con el incremento del grado de modificación de las superficies. Esto es consecuencia de la creciente cantidad de grupos carboxílicos, provenientes del AA injertado. En las películas con grados de injerto por encima de  $1' 30''$  de exposición UV, no fue posible determinar el WCA debido a la rugosidad y excesiva mojabilidad de las superficies, lo cual generó la dispersión inmediata de la gota de  $\text{H}_2\text{O}$  al entrar en contacto con estas películas.



**Figura 3.1.13.** WCA de superficies BOPP modificadas a diferentes tiempos de irradiación UV: a) BOPP comercial ( $42 \text{ dyn/cm}^2$ ) sin injerto; b) BOPP-g-AA con un tiempo de irradiación de 30"; c) BOPP-g-AA con un tiempo de irradiación de 45"; c) BOPP-g-AA con un tiempo de irradiación de 1'.

El atributo de la "claridad" o transparencia de una película, es determinado por su capacidad de transmitir una imagen formada por la luz que la atraviesa. Es decir, está directamente relacionada con la transmitancia regular de la película (ASTM D1746 2003).

Los resultados de transmitancia de algunas películas modificadas, se indican en la Tabla 3.1.6. En ella se observa que los materiales que fueron injertados usando tiempos de irradiación menores a 45", conservan hasta el 84% de la transparencia propia de una película de BOPP comercial sin modificar. Como era de esperar, la "opacidad" de las películas modificadas, aumenta con el grado de injerto de las superficies.

	Tiempo de irradiación	Transparencia relativa al BOPP comercial
BOPP	-	100%
BOPP- g- AA	30"	99,5%
BOPP- g- AA	45"	84,0%
BOPP- g- AA	1'	30,5%
BOPP- g- AA	2'	9,2%

**Tabla 3.1.6.** Transparencia de películas de BOPP-g-AA con diferentes tiempos de irradiación.

#### Fotoinjerto de AA en presencia de los vapores del monómero

Estudios sobre la utilización de radiación UV en atmósferas reactivas, han demostrado que esta metodología es una manera sencilla y eficaz de introducir determinados grupos funcionales en la superficie de los polímeros (Weibel et al. 2009).

En esta sección se mostrarán los resultados obtenidos, acerca del uso de una técnica de injerto de AA en presencia de los vapores del monómero y asistida por luz UV. Dicha experiencia, fue llevada a cabo en el laboratorio de Fotoquímica y Superficies (LAFOS) de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil, con la colaboración del Dr. Daniel Esteban Weibel.

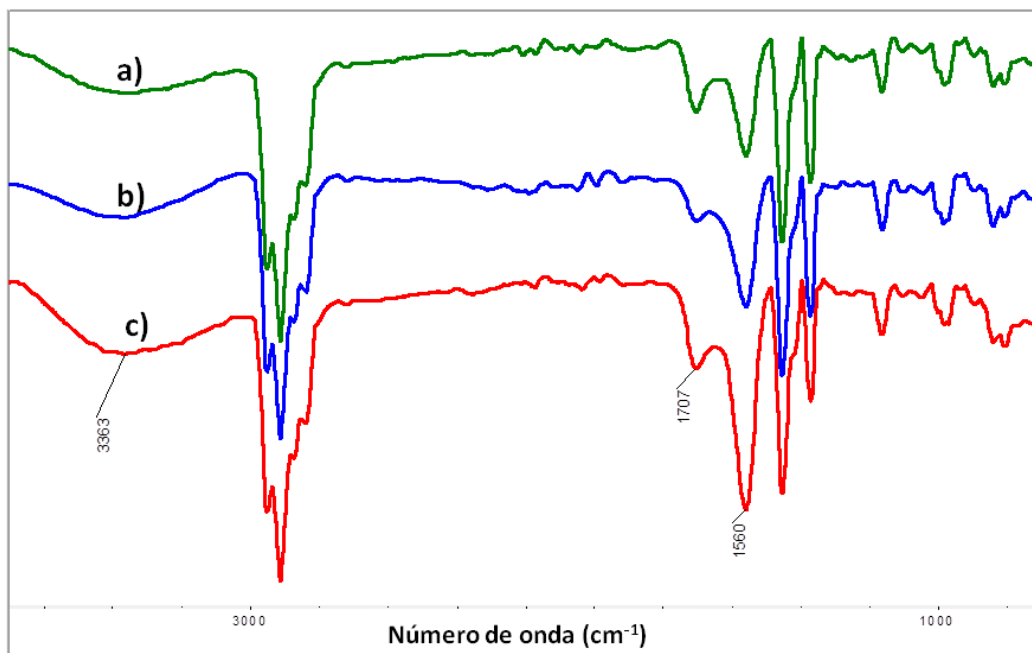
La metodología consistió en exponer una superficie de BOPP (1,5 cm x 2,5 cm), a una radiación UV proveniente de una lámpara de mercurio de media presión. Este proceso fue llevado a cabo dentro de un reactor herméticamente cerrado, en el cual mediante una corriente de N<sub>2</sub> se introdujo vapores del monómero AA. Distintas superficies del polímero fueron tratadas de igual manera pero por diferentes periodos de tiempo de exposición UV.

Los valores de WCA medidos para cada una de las superficies modificadas, figuran a continuación en la tabla 3.1.7:

Sustrato modificado	Tiempo de irradiación	WCA (°)
BOPP	-	(89,0 ± 1,0)°
BOPP 1	15'	(43,3 ± 1,7)°
BOPP 2	30'	(44,0 ± 1,9)°
BOPP 3	60'	(48,1 ± 1,7)°

**Tabla 3.1.7.** Modificación de BOPP asistido por UV en presencia de vapores de AA. Valores de WCA.

En la Figura 3.1.14, se exponen los espectros FT IR- ATR obtenidos de cada una de las películas injertadas por esta metodología.



**Figura 3.1.14.** Espectros FT IR- ATR de películas de BOPP-g-AA obtenidas por fotoinjerto en presencia de vapores de monómero. a) 15 min de irradiación UV; b) 30 min de irradiación UV; c) 60 min de irradiación UV.

Los resultados obtenidos, confirman la presencia de los grupos C=O y -OH en la superficie de las películas modificadas: En los espectros **a**, **b** y **c** (Figura 3.1.14), se observa una banda ubicada alrededor de  $3363\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de estiramiento del grupo -OH. En dichos espectros, también se encuentran bandas en  $1709\text{ cm}^{-1}$  y  $1557\text{ cm}^{-1}$ , atribuibles a la tensión de C=O de -COOH y C-O de  $\text{-COO}^-$ , respectivamente. La presencia de estos grupos electronegativos e hidrofílicos en las superficies modificadas, es la responsable del descenso observado de los valores de WCA (Tabla 3.1.7). En estos datos, se observa que entre las muestras irradiadas por diferentes periodos de tiempo (15, 30 y 60 min), no hubo diferencias significativas en el valor de WCA.

Los resultados obtenidos indican que la reacción de co-polimerización de AA se llevó a cabo mediante la simple irradiación con luz UV. Como se mencionó anteriormente, este fenómeno también es observado, en reacciones de injerto, donde se utilizan otras fuentes de energía (plasma, descarga corona, ultravioleta de vacío, etc.) (Rajajeyaganthan et al. 2011). La posibilidad de generar el injerto de las películas de BOPP en presencia de

los vapores del monómero, significa una gran ventaja desde el punto de vista metodológico para una posible aplicación tecnológica a mayor escala. Sin embargo, en este caso en particular, fueron necesarios elevados tiempos de radiación UV para conseguir grados de modificación apreciables por las técnicas utilizadas. Para evitar esto, el uso de una fuente de luz UV de mayor potencia, o la presencia de un fotoiniciador en la mezcla reactiva, son estrategias viables y capaces de reducir el tiempo de reacción de polimerización (Dorval Dion and Tavares 2013).

### 3.1.3 Conclusiones parciales

Se evaluó el uso de técnicas de alta energía, como son el tratamiento plasma y la descarga corona, para llevar a cabo el injerto de AA en películas de BOPP comercial. Para esto, se realizaron experiencias adaptadas a instalaciones de tipo industrial. Las limitaciones inherentes al equipamiento utilizado y las condiciones de uso de los mismos, impidieron lograr satisfactoriamente la modificación superficial deseada. Sin embargo, se adquirió conocimiento del potencial de estas metodologías y equipamientos, para futuras aplicaciones en lo que respecta a modificación superficial.

Con el mismo objetivo de llevar a cabo el injerto de AA en superficies comerciales de BOPP, se exploró y optimizó cada uno de los parámetros involucrados en la reacción de fotoinjerto previamente estudiada por Costamagna *et al.* Se exploraron variables como: la hidrofiliidad del sustrato, la distancia entre la fuente de irradiación y el sustrato, la concentración del fotoiniciador y el tiempo de reacción. Luego del análisis de cada una de estas variables, se estableció un conjunto de condiciones para el sistema estudiado, con el cual se efectuaron las posteriores reacciones de injerto.

El porcentaje de injerto o grado de modificación de las superficies tratadas (%G), mostró una notable dependencia con el tiempo de radiación: al incrementarse el tiempo de exposición UV, el injerto de AA sobre la superficie se hizo cada vez más importante. Los estudios de ángulo de contacto, espectroscopia IR y la cuantificación de grupos -COOH en la superficie, dieron cuenta de este comportamiento.

Paralelamente, también se consiguió el injerto de AA en superficies de BOPP mediante reacción de fotoinjerto en presencia de vapores del monómero. Esta técnica resultó ser sencilla, limpia y de fácil aplicación. Sin embargo, mediante esta metodología, se consiguieron bajos porcentajes de modificación, comparados a los obtenidos por la metodología de fotoinjerto en solución reactiva. Se estima que la ausencia de fotoiniciador en el sistema de reacción, fue una de las causas de los extensos tiempos de irradiación necesarios para llevar a cabo la reacción de injerto. Por otro lado, la posibilidad de ingresar los vapores de AA en el sistema de reacción, representa una herramienta interesante a la hora de la posible aplicación a mayor escala.



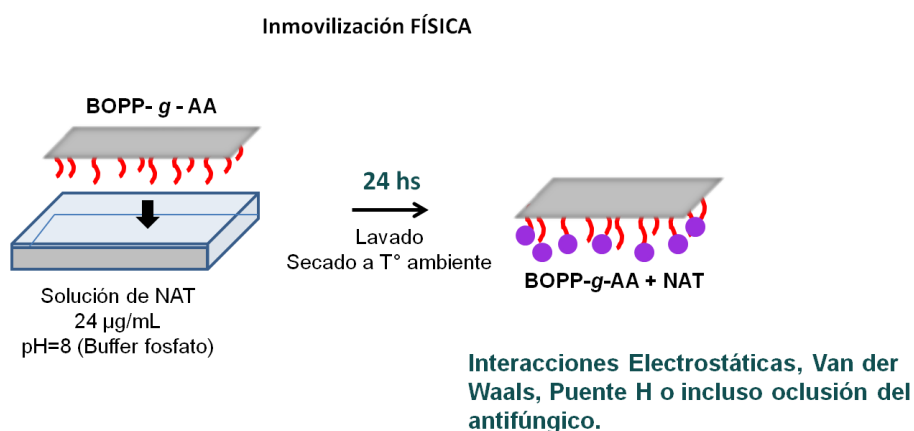
### **3.2 Incorporación del agente antifúngico (NAT) en películas de BOPP.**

*Para obtener sistemas activos antimicrobianos, es necesario conferirle al material del cual está hecho el envase, las propiedades biológicas correspondientes a través de la incorporación de agentes bioactivos. El agente antimicrobiano escogido en este trabajo de Tesis, fue la natamicina (NAT), también conocida como pimaricina. La incorporación de dicho compuesto a superficies de BOPP, fue llevada a cabo a través de: i) su interacción física con películas previamente injertadas con AA (BOPP-g-AA), ii) mediante la unión covalente a películas de BOPP-g-AA y iii) a través de su incorporación a una resina polimérica, que posteriormente fue extendida a modo de recubrimiento o “coating” sobre las películas de BOPP comerciales sin modificar. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada una de estas alternativas de inmovilización.*



### 3.2.1. Inmovilización física de NAT en superficies de BOPP-g-AA.

Se propuso la incorporación física del agente antifúngico NAT, a la superficie de películas plásticas de uso comercial de BOPP. Como se mencionó anteriormente, este tipo de inmovilizaciones, requiere que tanto el soporte polimérico, como la biomolécula en cuestión, cuenten con los grupos funcionales adecuados que aseguren su interacción específica. En este caso, se capitalizó la gran variedad de grupos funcionales presentes en la molécula de NAT, para conseguir su interacción con películas de BOPP injertadas con AA (BOPP-g-AA) (3.1).



**Figura 3.2.1.** Inmovilización de NAT en superficies injertada, BOPP-g-AA

En la Figura 3.2.1 se muestra el procedimiento general con el cual se llevó a cabo la unión física de NAT a las películas modificadas. En este proceso de inmovilización, serían tres los factores principales por los cuales se genera la unión de la NAT a la película de BOPP-g-AA:

1) *Interacción electrostática*: La presencia de los grupos carboxílicos pertenecientes a las cadenas de poliAA injertadas funcionarían de puntos de unión, al interactuar electrostáticamente con los grupos amino protonados de la molécula de NAT (Costamagna 2006).

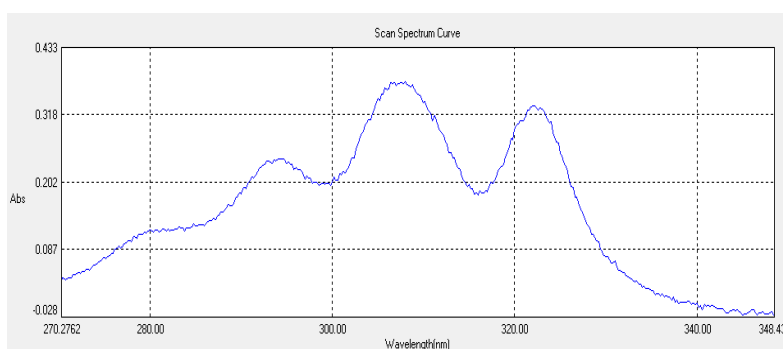
2) *Interacciones puente hidrogeno y Van der Waals*: La gran diversidad de grupos funcionales presentes en la molécula de NAT (oxidrilo, amino, éster, éter, epóxido, ácido carboxílico y dobles enlaces conjugados), sumado a que la estructura de esta es

considerablemente mayor a la de las unidades monoméricas de AA, permitiría que se establezca una gran cantidad de interacciones puente hidrógeno y Van der Waals con las cadenas de AA injertadas (García-Vargas et al. 2014).

3) *Oclusión del agente bioactivo*: Las modificaciones por fotoinjerto usualmente son acompañadas por reacciones de entrecruzamiento, reordenamientos y formación de dominios puntuales de homopolímero. Esto conlleva a una arquitectura compleja de la superficie, con una morfología rugosa e irregular que normalmente es responsable de la oclusión o “entrampe” de moléculas activas; en este caso, NAT (Costamagna 2006; J Deng et al. 2009; J M Goddard and Hotchkiss 2007).

#### Determinación de NAT en las superficies inmovilizadas.

Uno de los objetivos específicos, planteados en el presente trabajo de Tesis y de particular interés para la posterior aplicación tecnológica de estos sistemas, fue determinar cuantitativamente NAT unida a las películas modificadas (BOPP-*g*-AA + NAT). Para llevar a cabo esta determinación, las películas con NAT inmovilizada fueron sometidas a una extracción capaz de remover el compuesto, para posteriormente determinar su concentración mediante espectrofotometría UV-Visible. En la Figura 3.2.2, se muestra el espectro UV- Visible de la NAT, obtenido en las condiciones utilizadas.



**Figura 3.2.2.** Espectro UV- Visible de la NAT.

Para optimizar el método de cuantificación, se evaluó el uso de dos solventes de extracción y se determinó el porcentaje de recuperación de NAT para cada uno de ellos. Los solventes estudiados fueron una mezcla de metanol:ácido acético (MeOH:Ac; 95:5) y

agua Milli-Q. Ambas extracciones se realizaron al resguardo de la luz y a 10°C para evitar la descomposición de NAT.

Para llevar a cabo el ensayo de recuperación, se utilizaron dos superficies de BOPP-*g*-AA de porcentajes de injerto (%G) diferentes: a) 0,5% y b) 7%. Los tiempos de extracción y porcentajes de recuperación obtenidos para cada superficie, se muestran en la tabla 3.2.1.

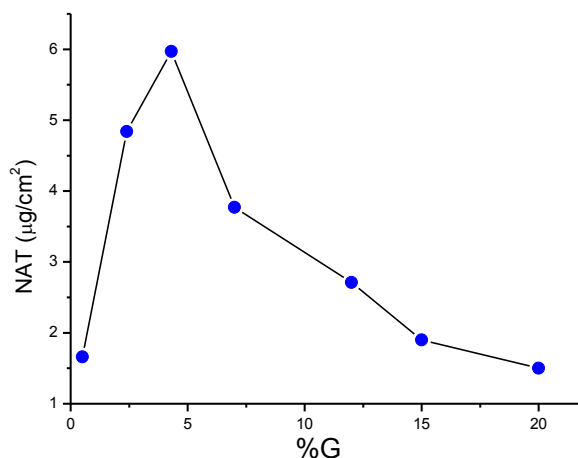
	%G	Solvente de extracción	Tiempo (hs)	Porcentaje de recuperación
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	0,5	MeOH: Ac	5	90%
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	7	MeOH: Ac	5	98%
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	0,5	H <sub>2</sub> O	5	52%
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	0,5	H <sub>2</sub> O	123	52%
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	7	H <sub>2</sub> O	5	8%
BOPP- <i>g</i> - AA + NAT	7	H <sub>2</sub> O	123	33%

**Tabla 3.2.1.** Condiciones de extracción de NAT de superficies modificadas. Porcentajes de recuperación.

De los resultados obtenidos, se desprende que luego de 5 hs de extracción, la mezcla de MeOH:Ac permitió recuperar un 90 y 98% de la NAT total, presente en las películas 0,5% y 7% G, respectivamente. Con el uso de H<sub>2</sub>O Milli-Q, en todos los casos se obtuvieron recuperaciones menores al 52%, dependiendo del tiempo y el grado de injerto. Este comportamiento en parte es debido a la baja solubilidad de la NAT en agua, en tanto que en metanol y ácido acético, la solubilidad del antifúngico es elevada, lo cual facilitaría su extracción (Hanušová et al. 2010; Richey et al. 2000b; Suloff 1999).

Luego de desarrollar la metodología analítica para cuantificar NAT unida a las películas BOPP-*g*-AA, se determinó como varió la cantidad de antifúngico inmovilizado, en

función del grado de modificación (%G) de las superficies. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2.3.



**Figura 3.2.3.** Capacidad de carga de NAT por parte de películas de BOPP- g- AA con diferentes %G.

A medida que la modificación superficial de las películas de BOPP-g-AA se incrementó, la cantidad de NAT inmovilizada fue mayor. Esta tendencia se mantuvo hasta un valor crítico de 4,5 %G, en donde la NAT cuantificada por unidad de área fue de 6 µg/cm<sup>2</sup>. Por encima de este porcentaje de injerto, la cantidad de NAT inmovilizada en la superficie del polímero, disminuyó considerablemente con el aumento del %G.

El decaimiento de la capacidad de carga de NAT por parte de las películas con %G mayor al 4,5%, es debido a que junto con el avance de la reacción de injerto del polímero, se produce un mayor número de entrecruzamientos físicos y químicos entre las cadenas de poliAA; esto genera una estructura de red compacta, en donde el copolímero de injerto se comporta como un sólido ensamblado. En consecuencia hay un menor número de sitios de unión para la NAT y por lo tanto la interacción disminuye (Costamagna 2006; García-Vargas et al. 2014; J M Goddard and Hotchkiss 2007; Kato et al. 2003).

Dados estos resultados, para llevar a cabo la inmovilización de NAT, se seleccionaron películas con injertos menores al 4%, ya que se demostró que no son necesarios mayores modificaciones para unir eficientemente el agente antifúngico.

Además, pensando en la posible aplicación de estos sistemas, esto significa una ventaja en cuanto al ahorro de tiempo, energía y reactivos utilizados, ya que el porcentaje de injerto está directamente relacionado con el tiempo de irradiación insumido.

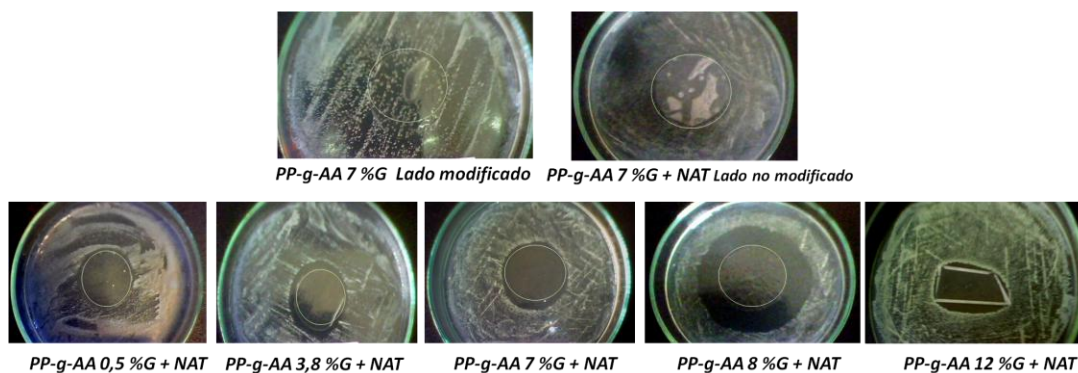
#### Actividad antifúngica de películas BOPP-g-AA + NAT

Los principales ensayos microbiológicos utilizados, para comprobar la eficiencia de una película con propiedades antibacterianas o antimicóticas, se basan en la capacidad de éstas para suprimir o inhibir el crecimiento de los microorganismos cuando son puestos en contacto directo con un medio de cultivo inoculado.

Para testear la actividad antimicótica de las películas de BOPP-g-AA + NAT, se realizaron ensayos de difusión en medio de cultivo específico para mohos y levaduras. Los mismos fueron llevados a cabo colocando discos de las películas modificadas, en contacto con la superficie del medio previamente inoculado con una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae*.

En estos ensayos, si las películas desarrolladas poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de los mohos y levaduras presentes en el área en contacto del medio de cultivo, significa que el antimicótico efectivamente se encuentra disponible para actuar biológicamente y que el proceso de inmovilización no ha dañado de manera crítica su capacidad antimicrobiana.

Al analizar los resultados de las placas ensayadas (Figura 3.2.4), se observa que las películas BOPP-g-AA + NAT, fueron capaces de inhibir completamente el desarrollo de hongos sobre la superficie del medio de cultivo. Además, se observa la presencia de halos de inhibición dependiendo del grado de injerto de cada película. Con estos ensayos, también se corroboró que la actividad antifúngica de las películas de BOPP-g-AA + NAT, está limitada únicamente al lado injertado con AA de la superficie de BOPP. Mientras que en el lado sin modificar y el lado únicamente injertado con el monómero, no se observó actividad inhibitoria.



**Imagen 3.2.4.** Ensayos microbiológicos de difusión en placa para superficies de BOPP-g-AA + NAT.

Pruebas de migración del agente antifúngico

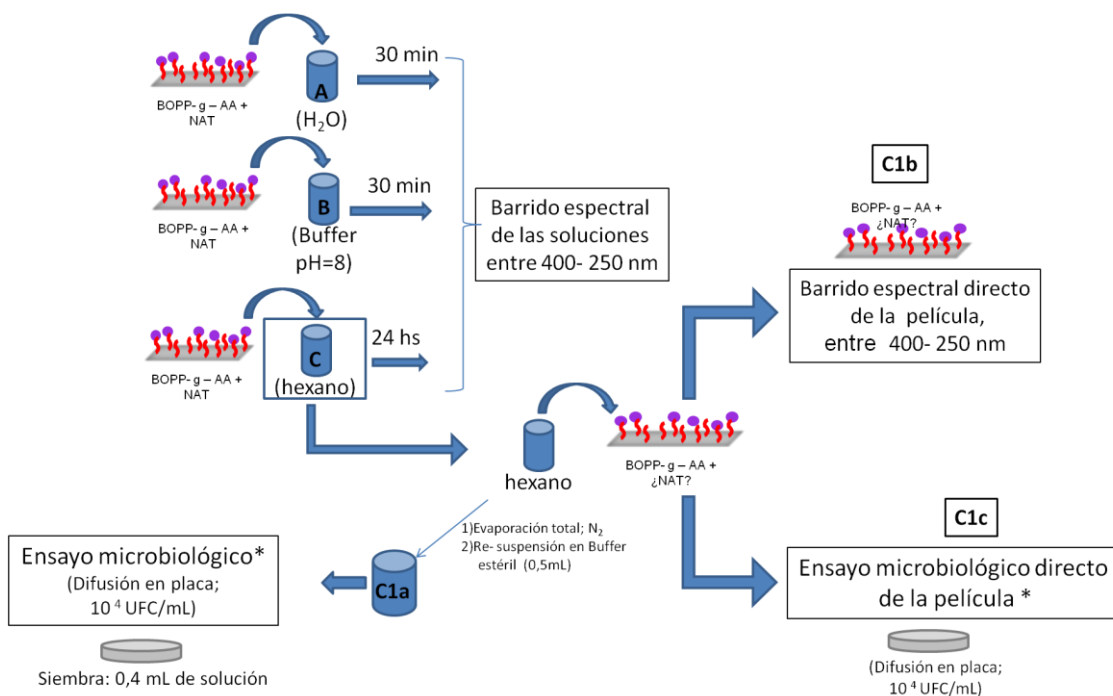
Determinar las condiciones en las cuales se lleva a cabo la posible transferencia del agente antifúngico, desde la matriz del envase hacia el alimento, es una consideración de suma necesidad en el desarrollo de esta clase de dispositivos (Han 2005). Conocer estos aspectos, determinará si el material puede ser utilizado como envase activo de alimentos grasos, alimentos con alto o bajo contenido de agua, alimentos secos, etc.

Como parte del trabajo de Tesis, se llevaron a cabo una serie de experiencias que ayudaron a establecer en qué clase de alimentos sería posible la aplicación de los sistemas desarrollados (BOPP-g-AA + NAT). Dichas experiencias, consistieron básicamente en la detección de la NAT liberada a diferentes medios líquidos, por parte de las películas bioactivas. Los medios líquidos ensayados fueron: a) solución buffer (pH=7), b) H<sub>2</sub>O destilada y c) hexano. La elección de estos dos últimos (b y c), se basó en su uso como simulantes de alimentos acuosos no ácidos y alimentos grasos, en algunos ensayos de migración específica, respectivamente.

Para llevar a cabo la experiencia, se utilizaron tres películas diferentes de BOPP-g-AA (2,5 %G) + NAT. Cada película fue sumergida por separado en alguno de los medios líquidos (a, b o c), por un periodo de tiempo determinado. Luego, se analizó cada uno de los líquidos en contacto con las películas, mediante espectrofotometría UV-Visible. En el caso del sistema formado por la película activa y hexano, luego de 24 hs de permanecer en contacto, se evaporó el solvente con el objetivo de realizarle a los residuos presentes,

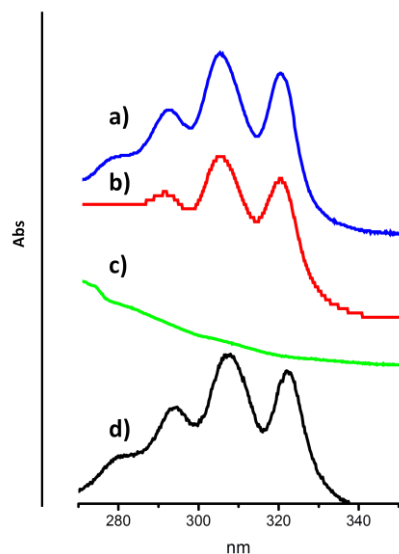


un ensayo de actividad antimicrobiana. Al mismo tiempo, a la película inmovilizada que estuvo en contacto con el solvente orgánico, se le realizó un barrido espectral UV-Visible, con el propósito de determinar mediante esta técnica la presencia de NAT. En la Figura 3.2.5 se muestra esquemáticamente los pasos y ensayos realizados en la experiencia completa.



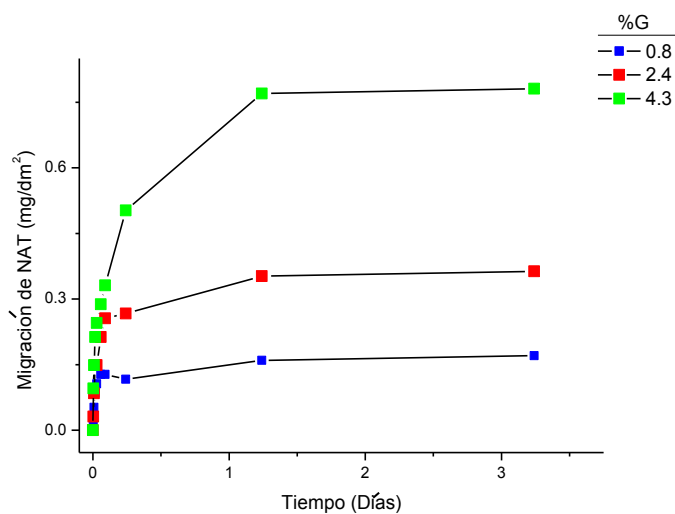
**Figura 3.2.5.** Esquema de los ensayos realizados para la determinación de difusión de NAT en hexano,  $H_2O$  y buffer.

El análisis del espectro UV obtenido para las soluciones **A** y **B** después de 30 min, indica que hubo transferencia de NAT desde la película hacia el  $H_2O$  y el buffer, respectivamente (Figura 3.2.6, a) y b)).



**Figura 3.2.6.** Espectros UV de a)  $H_2O$  en contacto con película BOPP-g-AA + NAT (**A**); b) Solución buffer en contacto con película BOPP-g-AA + NAT (**B**); c) hexano en contacto con película BOPP-g-AA + NAT (**C**); d) película BOPP-g-AA + NAT luego de estar en contacto con hexano (**C1b**)

Con el propósito de conocer la cinética de migración del compuesto, adicionalmente se realizaron ensayos de liberación de NAT en agua. En la Figura 3.2.7 se muestran la cantidad de antifúngico liberado en función del tiempo, para películas BOPP-g-AA + NAT con diferentes porcentajes de injerto (%G).



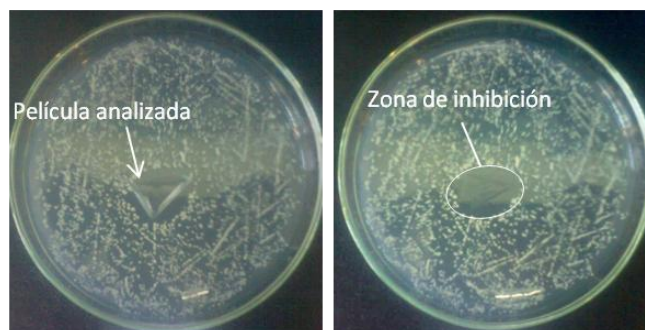
**Figura 3.2.7.** Migración de NAT de películas BOPP-g-AA + NAT en agua.

En el caso de la superficie de BOPP-*g*-AA con 0,8 %G, la máxima cantidad de NAT liberada fue de 0,17 mg/dm<sup>2</sup> y se registró a partir de las 2 horas de sumergidas las películas. Este valor representa un 40% del total de antifúngico presente en la superficie activa. Por su parte, las películas con valores de 2,4 %G y 4,3 %G, en un periodo de 32 hs liberaron como máximo un 55% (0,35 mg/dm<sup>2</sup>) y 72% (0,77 mg/dm<sup>2</sup>), respectivamente, del total de NAT. Como se expresó anteriormente, estos valores de liberación de NAT en agua, seguramente se encuentran limitados por la solubilidad del antifúngico en este medio (Hanušová et al. 2010).

En cuanto a la migración de NAT en hexano, (Figura 3.2.5, C), el espectro UV del solvente sugiere que en el periodo de 24 hs no ha tenido lugar la transferencia del antifúngico (Figura 3.2.6, c)). El ensayo microbiológico de los residuos de la evaporación del hexano (**C1a**), mostró que estos no fueron capaces de inhibir el desarrollo de levaduras en la superficie del medio de cultivo y que por lo tanto, no habría NAT en los mismos (Figura 3.2.8). Adicionalmente, los ensayos realizados a la película de BOPP-*g*-AA + NAT luego de estar en contacto con el hexano (**C1b** y **C1c**); arrojaron ambos, resultados positivos en cuanto a la presencia de NAT en la superficie del polímero: en primer lugar, el espectro obtenido directamente de la película modificada (**C1b**), muestra el perfil típico del compuesto antifúngico (Figura 3.2.6 d); en segundo lugar, el ensayo microbiológico de dicha película (**C1c**), mostró que ésta es capaz de inhibir totalmente el desarrollo de las levaduras en el medio de cultivo (Figura 3.2.9).



**Figura 3.2.8.** Ensayo microbiológico de los residuos de evaporación provenientes de hexano (C1a).



**Figura 3.2.9.** Ensayo microbiológico de película de BOPP-g- AA + NAT después de estar 24 hs en contacto con hexano (C1c).

El conjunto de resultados obtenidos en hexano, asegura que el grado de transferencia de NAT, desde la película a dicho solvente, fue considerablemente bajo. Y que además, luego de 24 hs, estas superficies conservaron su actividad antifúngica. Este comportamiento podría deberse a la pobre capacidad del hexano para interactuar con las cadenas injertadas de poli AA y de solvatar a la molécula de NAT: el carácter apolar del hexano haría que su interacción con las cadenas polares de poliAA injertado, sea desfavorable. Adicionalmente, la baja solubilidad de la NAT en este compuesto y el tipo de interacciones (iónicas, Van de Waals, puente hidrógeno, etc.) que ésta mantiene con la superficie y el interior de la estructura polimérica, ayudarían a que el proceso de solvatación en estas condiciones, no esté favorecido.

La interpretación de estos resultados, nos permite inferir que el uso de estos dispositivos antimicrobianos, en alimentos con elevado contenido graso (por ejemplo los quesos), evitaría el desarrollo microbiano sobre la superficie de la matriz alimenticia y al mismo tiempo aseguraría una baja migración del compuesto hacia el interior de la misma, conservando así sus propiedades y garantizando su seguridad alimentaria.

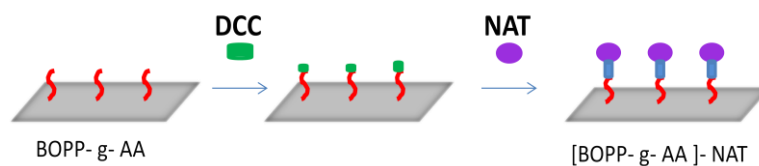
### **3.2.2 Inmovilización covalente de NAT en superficies de BOPP-g-AA.**

La unión covalente de compuestos bioactivos en la superficie de un polímero, ha adquirido gran importancia en la industria biomédica, textil, electrónica y por supuesto en

la de envases para alimentos. El concepto global de esta clase de modificación es similar al que se viene desarrollando hasta aquí: en una primera instancia es necesario conseguir la funcionalización superficial de un polímero, cuyas propiedades de “bulk” o matriz, se desee conservar (injerto de monómeros específicos en la superficie). Luego, a través del intermediario necesario, se lleva a cabo la unión covalente de la molécula bioactiva (J.M. Goddard and Hotchkiss 2007).

El método de inmovilización covalente de NAT desarrollado en este trabajo, es similar al utilizado en reportes anteriores para la inmovilización de enzimas y otras biomoléculas sobre superficies poliméricas (Chinchilla et al. 2001; Li et al. 1998; N. Tsubokawa, Hosoya and Kurumada 1995).

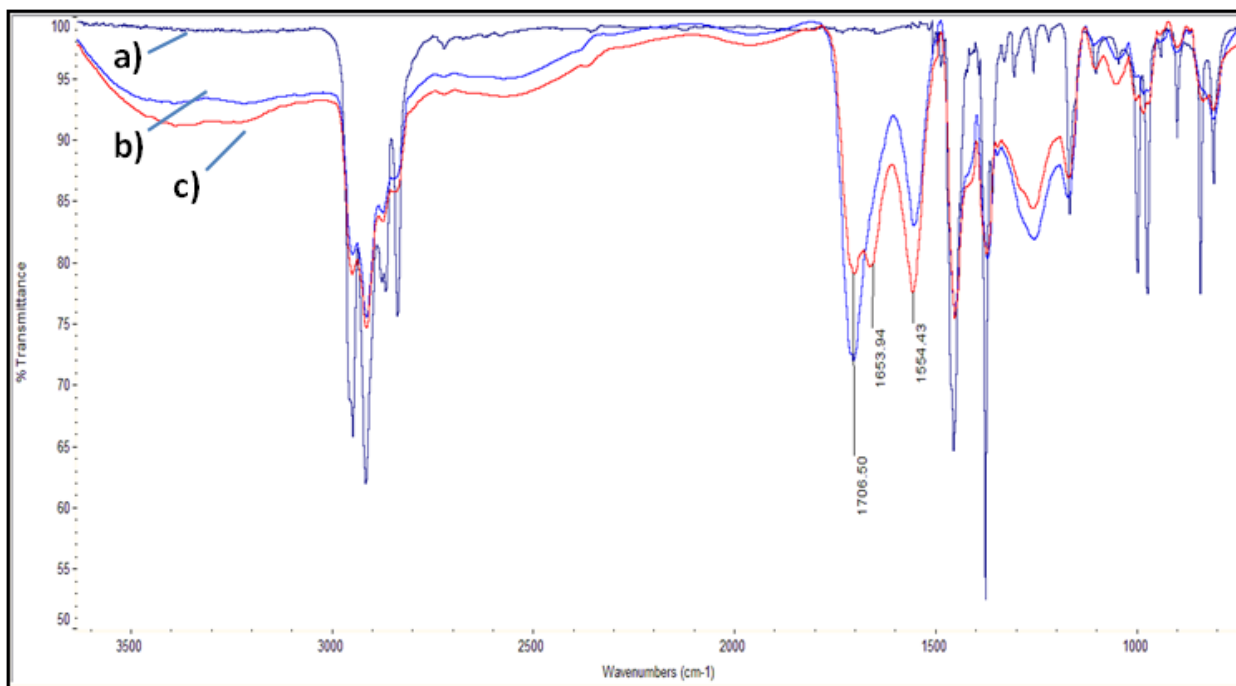
En esta ocasión, los grupos carboxílicos de las películas BOPP-*g*-AA con 1 %G, fueron pre-activados con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), para luego ser acoplados a NAT a través de la formación de un enlace amida (Figura 3.2.10).



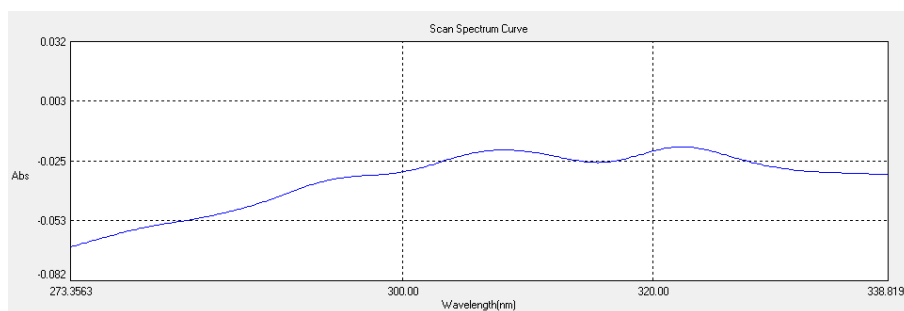
**Figura 3.2.10.** Inmovilización covalente de NAT en película de BOPP-*g*-AA.

La Figura 3.2.11 muestra los espectros FT IR-ATR de la película injertada antes (BOPP-*g*-AA) y después de la inmovilización covalente de NAT ([BOPP-*g*-AA]-NAT). En comparación al espectro de la superficie de BOPP-*g*-AA (Espectro a)), en el espectro de la película [BOPP-*g*-AA]-NAT (Espectro b)), se observa la presencia de una señal a  $1653\text{ cm}^{-1}$ , característica de la vibración del enlace C=O de amida. Además, en este espectro la intensidad de la señal de C=O de ácido carboxílico, se ve disminuida en relación a la del espectro de la película BOPP-*g*-AA. Por su parte, en el espectro del lado no modificado por injerto (Espectro c)), no se observaron diferencias al compararlo con el espectro de una película de BOPP comercial sin modificar. Adicionalmente, el espectro UV realizado a la película [BOPP-*g*-AA]-NAT (Figura 3.2.12), presenta los máximos de absorbancia

característicos de la molécula de NAT. Estos resultados indican que la inmovilización covalente de NAT, fue llevada a cabo de manera exitosa sobre la superficie de la película de BOPP-g-AA.



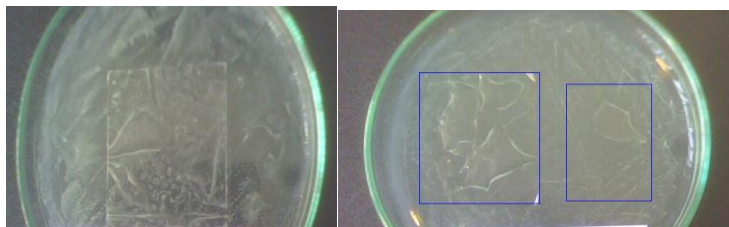
**Figura 3.2.11.** Espectro FT IR- ATR de a) BOPP-g- AA, c) [BOPP- g- AA]-NAT lado inyectado, c) [BOPP- g- AA]-NAT lado sin inyectar.



**Figura 3.2.12.** Espectro UV de película [BOPP- g- AA]-NAT.

### Actividad antifúngica de películas [BOPP-g-AA]-NAT.

La actividad biológica de estas películas fue evaluada mediante su eficiencia para inhibir el desarrollo de levaduras en medios de cultivo. La Figura 3.2.13 muestra los resultados de los ensayos microbiológicos en placa.



**Figura 3.2.13.** Ensayo microbiológico de película de [BOPP-g-AA]-NAT

Se puede observar que en toda la superficie del medio de cultivo, incluso debajo de las películas de [BOPP-g-AA]-NAT, hubo desarrollo de las colonias de levaduras inoculadas. Lo cual indica que la actividad antifúngica de la NAT unida covalentemente, en estas condiciones, se ha visto afectada de manera crítica.

La ausencia de actividad antifúngica observada, podría atribuirse al impedimento del agente antimicrobiano para interactuar de manera eficiente con componentes de la pared celular de las levaduras. Diversos estudios indican que la molécula de NAT afectaría ciertas funciones de membrana de los hongos, a través de su unión específica con el ergosterol presente en la célula (Leeuwen et al. 2013; Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014). Al estar unida covalentemente, la disponibilidad de NAT para interactuar con los componentes celulares de los hongos se vería alterada y por lo tanto, también su efectividad antifúngica (Silvestre, Duraccio, and Cimmino 2011). Probablemente, una disposición de las cadenas injertadas, en donde exista una mayor movilidad de la molécula bioactiva y se reduzcan inconvenientes estéricos, evitaría que la actividad antimicrobiana de las películas modificadas se vea comprometida como en este caso.

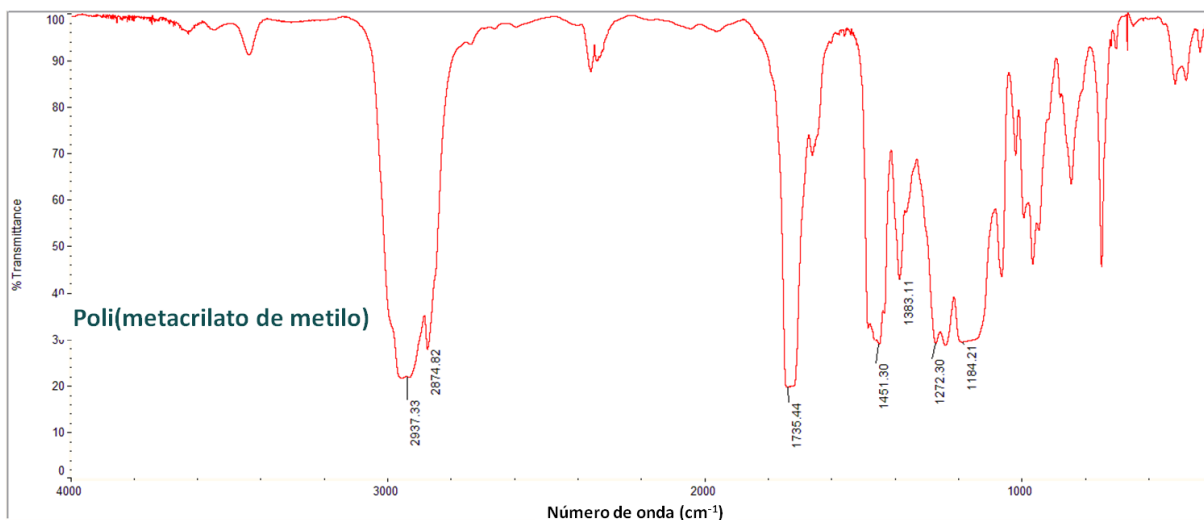
### **3.2.3 Recubrimiento antimicrobiano de superficies de BOPP comercial.**

La preparación de las películas activas con recubrimiento o “coating” antimicrobiano (BOPP/RA:NAT), se llevó a cabo sobre películas de BOPP comercial. Para esto se extendió manualmente sobre las superficies de BOPP, una mezcla de resina

polimérica y NAT (RA:NAT, a partir de aquí). La resina utilizada en esta ocasión, corresponde a polimetacrilato de metilo disuelto en acetato de etilo. El espectro infrarrojo, determinado experimentalmente para esta sustancia, se muestra en la Figura 3.2.14. Cabe destacar, que este polímero se encuentra incluido en el C.A.A, en la “*Lista positiva de polímeros y resinas para envases y equipos en contacto con alimentos*”, en el Capítulo IV. Art 207 (CAA, 2013).

El estudio de las películas BOPP/RA:NAT, se realizó para dos formulaciones diferentes del *coating* RA:NAT: 0,25% y 5% en peso de NAT. El aspecto de las películas con *coating* 0,25%, no presentó cambios visibles en comparación a las superficies de BOPP sin recubrir, siendo estas transparentes y uniformes.

El C.A.A. exige realizar a aquellos recubrimientos de polimetacrilato de metilo destinados a formar parte del envase de un producto alimenticio y cuyo espesor sea mayor a 0,2 mm, una serie de lavados a temperatura ambiente por 24 hs (CAA, 2013). Las películas con *coating*, desarrolladas en este trabajo de Tesis, no estarían al alcance de esta exigencia, ya que el espesor promedio medido para estas películas fue de  $0,020 \pm 0,001$  mm, lo cual significa entre 0,1- 0,5% el peso de la película de BOPP.

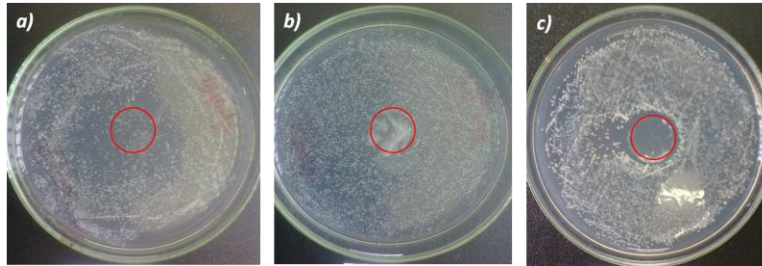


**Figura 3.2.14.** Espectro infrarrojo de resina acrílica empleada en los recubrimientos con propiedades antimicrobianas.



### Actividad antifúngica de películas BOPP/RA:NAT

A continuación, en la Figura 3.2.15, se muestran las placas correspondientes a los ensayos de difusión en medio de cultivo, para una película BOPP/RA:NAT 0,25%.



**Figura 3.2.15.** Ensayos microbiológico en medio de cultivo, frente a *S. cerevisiae* de a) BOPP control; b) BOPP/RA; c) BOPP/RA:NAT- 0,25 % p/p.

Como puede observarse en las imágenes, hay una completa inhibición de las levaduras por parte de la película BOPP/RA:NAT. En la placa c), correspondiente a la película BOPP/RA:NAT 0,25%, se puede observar en el agar en contacto con la película bioactiva, un pequeño halo de inhibición de 2 mm, lo cual condice con el hecho de que el agente antifúngico debe migrar a través del *coating* para ejercer su efecto antimicrobiano sobre la superficie (Hauser and Wunderlich 2011).



**Figura 3.2.16.** Consecutivos ensayos microbiológico en medio de cultivo, frente a *S. cerevisiae* de BOPP/RA:NAT- 5 % p/p.

La Figura 3.2.16 corresponde a ensayos de difusión en placa, realizados consecutivamente a una misma película de BOPP/RA+ NAT, 5%. Es decir, se realizó con una misma superficie recubierta, sucesivos ensayos microbiológicos en placas diferentes, con una separación de 48 hs cada uno (tiempo suficiente para visualizar el desarrollo de

las colonias en el medio de cultivo, a temperatura ambiente). Como se puede observar, la película inhibió el crecimiento de los microorganismos en repetidas aplicaciones, generando un halo de difusión en todos los casos. Estos resultados corroboran, además de la eficiente actividad antifúngica del sistema, que la NAT puede difundir a través del material, para luego hacerlo en la superficie del agar. Y que por lo tanto, su actividad antifúngica es el resultado de un adecuado balance entre la velocidad de difusión de la NAT y la velocidad de crecimiento de las levaduras. Esta es una consideración necesaria y muy valiosa a tener en cuenta en el diseño de un envase bioactivo, ya que define la efectividad del material ante la presencia y el desarrollo de ciertos microorganismos en la superficie del alimento (Han 2005; Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014). La conservación de las propiedades antimicrobianas, demostrada a través de los sucesivos ensayos de inhibición, reviste gran importancia práctica, debido a que permitiría la reutilización del envase luego de cada vez que éste sea retirado de la superficie del alimento.

### **3.2.4 Conclusiones parciales.**

Se evaluaron diferentes estrategias para otorgarle propiedades antimicrobianas a la superficie de películas plásticas de uso comercial. Para ello el antifúngico NAT, comúnmente utilizado en la industria alimenticia, fue incorporado a la superficie de películas de BOPP mediante tres estrategias diferentes: A) A través de su unión de tipo física con películas de BOPP previamente modificadas por el injerto de AA (BOPP-*g*-AA), B) A través de su unión covalente a superficies previamente injertadas (BOPP-*g*-AA) y C) En forma de *coating* de superficies de BOPP comercial sin modificar.

La NAT fue eficientemente unida a superficies de BOPP-*g*-AA mediante interacciones de tipo iónica, Van der Waals, puente hidrógeno, etc. Los ensayos microbiológicos de estas superficies, comprobaron que la NAT inmovilizada ejerció su efecto antimicrobiano, inhibiendo el desarrollo de levaduras en la superficie de medios de cultivo. La presencia de halos de difusión y los ensayos de liberación en medios acuosos,

sugieren que el agente activo es capaz de migrar desde las películas a los sistemas con elevado porcentaje de agua. Por otro lado, el ensayo de migración en un medio apolar, simulando el entorno de un alimento graso, demostró que la difusión del antifúngico no tuvo lugar en esas condiciones. Por lo tanto, que las superficies conservaron su interacción con la NAT y consecuentemente, su actividad antimicrobiana.

Se desarrolló una metodología capaz de determinar el grado de fijación de la NAT por parte de las películas injertadas. Al respecto, hubo un aumento de la cantidad de NAT inmovilizada en relación al porcentaje de injerto (%G). Esta tendencia se mantuvo hasta un valor crítico de %G, por encima del cual, la cantidad de NAT presente en la superficie disminuyó considerablemente. Este fenómeno, es atribuido a reacciones de entrecruzamiento y reordenamientos superficiales dependientes del tiempo de radiación al cual fueron sometidas las películas. Pensando en la modificación que sería necesaria para la obtención de películas bioactivas por la incorporación de NAT, este comportamiento significa una ventaja, ya que se ha observado que películas con bajos %G (0,5 – 1 %G) son capaces de fijar eficientemente el antifúngico, dando como resultado películas con una notable actividad antimicrobiana.

En general la unión covalente de moléculas bioactivas a superficies poliméricas, es una herramienta efectiva en cuanto a la funcionalización del material y además útil para evitar la migración de los compuestos bioactivos. Sin embargo, en la práctica, este tipo de inmovilización suele ser de difícil aplicación a nivel industrial, debido a los requerimientos del proceso y los materiales utilizados.

En este trabajo de Tesis se consiguió la unión covalente del antifúngico NAT a la superficie de películas injertadas. Estudios de espectroscopia IR y espectrofotometría UV, demostraron que la unión de NAT fue efectiva. Sin embargo, en las condiciones ensayadas, las películas covalentemente inmovilizadas no fueron efectivas frente a la inhibición de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por último, se llevaron a cabo recubrimientos o *coatings* de superficies de BOPP, empleando un barniz polimérico conteniendo el agente antimicrobiano. La técnica resultó ser efectiva y de fácil aplicación. Estas superficies recubiertas, demostraron tener notable

actividad antimicrobiana frente a levaduras. Dicha actividad fue sostenida luego de repetidas aplicaciones de la misma superficie. Estos sistemas dejan abierta la posibilidad de estudiar a los mismos, como dispositivos de administración controlada del agente antifúngico, cuyo objetivo sea asegurar concentraciones óptimas de acción en la superficie del alimento.

### **3.3 Evaluación de la eficiencia de las películas modificadas**

*A continuación, se presenta el estudio de las propiedades antimicrobianas de las películas desarrolladas en esta Tesis. Dichas propiedades fueron evaluadas sobre la matriz real de un alimento perecedero, más precisamente, queso fresco. Para llevar a cabo este análisis, se tuvo en cuenta entre otros aspectos, las características microbiológicas de la matriz alimenticia, los efectos residuales de la aplicación de las películas activas, las condiciones de almacenamiento y por supuesto, el efecto inhibitorio resultante.*



### **3.3.1 Análisis de la carga microbiana en la matriz alimenticia.**

Como ya se mencionó en el transcurso de esta Tesis, la obtención de materiales poliméricos con propiedades antimicrobianas, resulta de gran interés en numerosos campos de aplicación, pero sin lugar a duda uno de los más atractivos es su utilización como envases activos para alimentos. En este sentido, hay varios factores que deben ser considerados en el diseño de esta clase de dispositivos: el material polimérico, los requerimientos del agente activo, el alimento en el que va ser aplicado y por supuesto, los microorganismos que se desea inhibir. Por lo tanto, el estudio de la efectividad antimicrobiana de estos sistemas, requiere un examen que implique la combinación de cada uno de estos elementos.

La mayoría de los reportes que evalúan la efectividad antimicrobiana de envases activos han sido llevados a cabo usando medios de cultivo, los cuales proveen las condiciones favorables para el desarrollo de los microorganismos y la efectiva actividad antimicrobiana de los materiales. Por lo general, los microorganismos que se desarrollan en medios de cultivo, no están expuestos a las condiciones de estrés a las que normalmente están sometidos en los alimentos. Del mismo modo, algunos sistemas antimicrobianos demuestran fuerte poder inhibitorio de microorganismos en medios de cultivo, pero no demuestran el mismo comportamiento cuando son evaluados en alimentos reales. Esto claramente muestra los efectos de la interacción entre los ingredientes del alimento, los microorganismos y el material activo (Han 2005).

El objetivo principal de este trabajo fue la obtención de películas plásticas con propiedades antifúngicas y por lo tanto, que puedan ser utilizadas como envases de contacto directo con alimentos, inhibiendo o retrasando el crecimiento de microorganismos en la superficie de los mismos. En esta búsqueda, el análisis microbiológico de la superficie del alimento, es un ensayo clave para la evaluación del poder antifúngico de las películas desarrolladas.

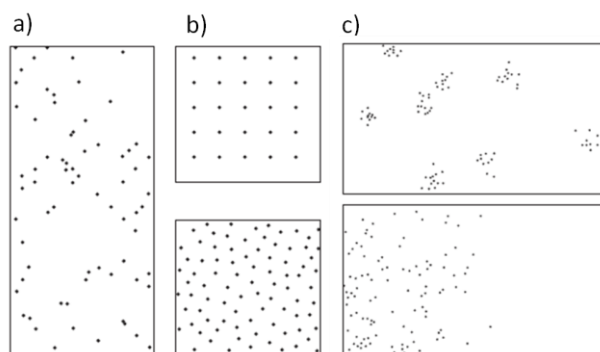
La contaminación por hongos y levaduras de productos lácteos, particularmente en quesos, es una de las causas de inconvenientes económicos y sensoriales más frecuentes que presentan estos alimentos. Este tipo de contaminación por lo general ocurre luego del

proceso de pasteurización y se produce en los ambientes de manufactura del queso (Richard, Derek, and Mark 2003; Torkar and Vengušt 2008).

En general, existen tres tipos de distribución espacial de microorganismos en la matriz alimenticia:

- *Distribución al azar.*
- *Distribución regular.*
- *Distribución heterogénea.*

En la Figura 3.3.1, se muestra gráficamente cada una de estas distribuciones.



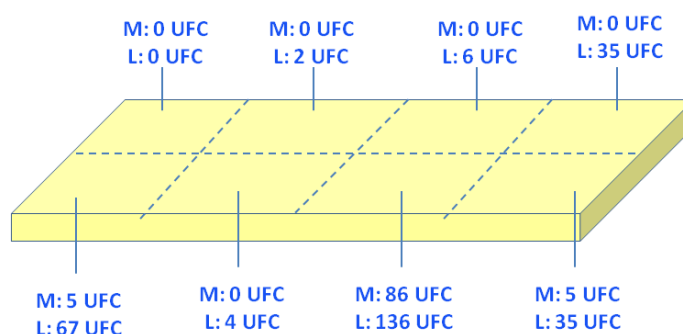
**Figura 3.3.1.** *Distribución espacial de microorganismos en alimentos: a) Distribución al azar; b) Distribución regular; c) Distribución heterogénea.*

En la distribución al azar (Figura 3.3.1, a)), existe la misma probabilidad para cualquier célula de microorganismo, de ocupar alguna posición libre en la matriz del alimento y por lo tanto, la presencia de un microorganismo no afectará la posición de otros individuos adyacentes. Cuando el nivel de microorganismos es elevado y hay hacinamiento, sin llegar a haber agregados de los mismos, se trata de una distribución regular (Figura 3.3.1, b)). Por último, en la distribución heterogénea ((Figura 3.3.1, c)), hay agregados o conjuntos de células microbianas en donde su patrón general de distribución, no está definido. Este último tipo de distribución es el más común en muchos alimentos y refleja indirectamente las consecuencias de factores externos en el crecimiento de los organismos. También es el tipo de distribución que, a los fines prácticos del análisis, presenta mayores desventajas y variabilidad en los resultados (Jarvis 2008).



Hay ciertos factores en los quesos que determinan sus características microbiológicas. El modo de elaboración, la actividad de agua (por ejemplo, quesos frescos), la presencia de microorganismos responsables del proceso de maduración, la consistencia, son algunos de los factores responsables de que los quesos sean una matriz compleja a la hora de su análisis microbiológico. Para confirmar el tipo de distribución de microorganismos (particularmente de mohos y levaduras) presentes en el queso fresco empleado en este trabajo, se realizó el ensayo microbiológico de una porción del alimento elegida al azar. Para esto, se dividió el área superficial de la porción, en sub-áreas de muestreo, para luego mediante la técnica de hisopado, determinar el número de microorganismos presentes en cada región.

En la Figura 3.3.2 se muestran los valores del recuento de cada área en el queso analizado. En ella se puede observar una gran dispersión en el recuento del número de mohos y levaduras, además de la presencia de conjuntos o agregados de dichos hongos. Como se subrayó anteriormente, esta distribución de tipo heterogénea, representa un serio inconveniente en el momento del análisis microbiológico, dado que incrementa la variabilidad del ensayo y dificultaría la correcta evaluación del poder antimicrobiano de las películas activas.



**Figura 3.3.2.** Distribución de colonias de mohos y levaduras en superficie de queso fresco analizada.

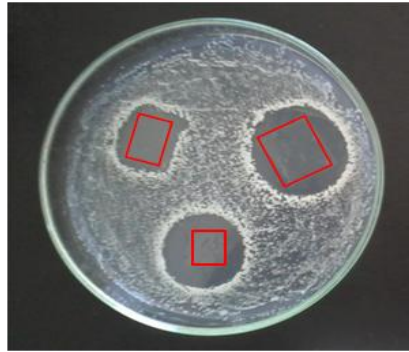
Para obtener una distribución regular y controlada de la carga microbiana en la superficie del queso, se inoculó a las porciones o fetas del mismo, con una suspensión de mohos ( $0,3 \cdot 10^6$  UFC/mL) y levaduras ( $1,9 \cdot 10^6$  UFC/mL) en condiciones controladas. Esta

contaminación intencional de la superficie, significó una carga de 150 UFC/cm<sup>2</sup> y 500 UFC/cm<sup>2</sup> de mohos y levaduras respectivamente. Dicha carga microbiana, según ensayos microbiológicos realizados a diferentes marcas de queso fresco y a los límites de aceptación previstos en el Código Alimentario Argentino (C.A.A.), es una carga en superficie considerablemente superior a la natural en un queso fresco para este tipo de microorganismos (CAA; 2010).

### **3.3.2 Prueba de la efectividad antimicrobiana de películas de BOPP-g-AA+ NAT en matrices reales de queso fresco**

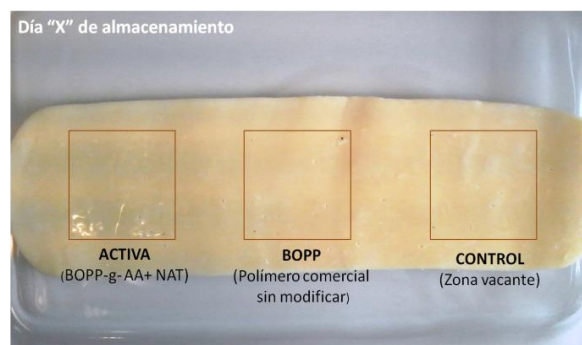
Para llevar a cabo el ensayo de efectividad antimicrobiana sobre la superficie del alimento, se utilizaron las películas de BOPP-g-AA desarrolladas (Sección 3.2). En esta ocasión, se seleccionaron superficies del polímero modificado con un porcentaje de injerto de 2,5%. Esta clase de películas, demostró tener buena capacidad de carga de NAT, sin resentirse de manera crítica ciertas características visuales como la transparencia y la rugosidad.

Las películas injertadas seleccionadas, fueron inmovilizadas físicamente con NAT (Sección 3.2) y posteriormente recortadas en cuadrados de 4 cm de lado. Previamente al ensayo de efectividad sobre el queso, se comprobó la actividad antimicrobiana de estas películas frente a *S. cerevisiae* y *A. niger*, a través de un ensayo de difusión en placa (Figura 3.3.3). Allí se evidenció que estas películas son capaces de inhibir completamente el crecimiento de ambas especies en la superficie del agar y que además existe una cierta transferencia de NAT, desde la película hacia el medio de cultivo, ya que se observó la presencia de un halo de inhibición en torno a la superficie de las películas activas ensayadas.



**Figura 3.3.3.** Ensayo de difusión en placa para películas de BOPP-g-AA (2,5%G)+ NAT, previo al ensayo en superficie de queso.

Luego de haber comprobado su actividad antifúngica, las superficies BOPP-g-AA + NAT, a las cuales vamos a identificar en este ensayo como “ACTIVAS”, las mismas fueron colocadas en íntimo contacto con sectores de la porción de queso previamente inoculada. Del mismo modo, otros sectores del alimento se pusieron en contacto con películas de BOPP comercial sin modificar, mientras que otros espacios permanecieron vacantes a modo de control (Figura 3.3.4). Cada una de las fetas de queso fresco en contacto con las películas a ensayar, fue envuelta en papel “film” de cocina para evitar la contaminación cruzada y la pérdida de humedad, luego fueron almacenadas 21 días a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$ )°C y 40% de humedad relativa.

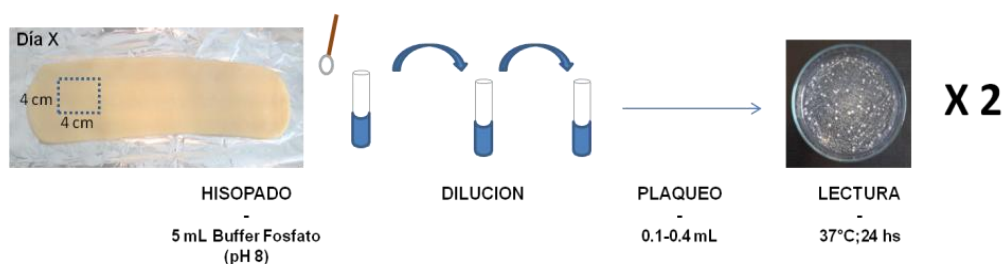


**Figura 3.3.4.** Disposición de las películas testeadas en el ensayo de efectividad antimicrobiana sobre queso fresco.

A diferentes tiempos de almacenamiento, se determinó el número de mohos y levaduras presentes en la superficie del queso en contacto con las películas ACTIVAS,

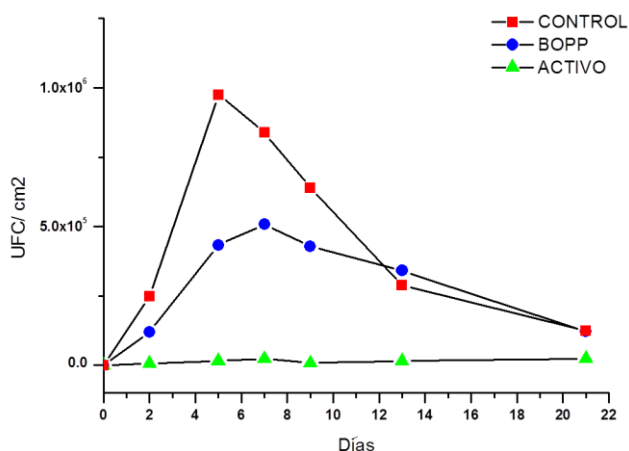
BOPP (películas del polímero comercial sin modificar) y CONTROL (áreas vacantes recubiertas únicamente por papel “film” de cocina). Cada determinación correspondiente a un día de almacenamiento, se realizó por duplicado.

La metodología empleada para el análisis microbiológico, fue el hisopado de las superficies de queso, seguido de la suspensión en buffer fosfato estéril (pH= 8). Posteriormente se realizó la siembra de los inóculos correspondientes en placas de agar para mohos y levaduras e incubación de las mismas a 37°C por 48 hs (Figura 3.3.5).



**Figura 3.3.5.** Ensayo microbiológico de superficies en contacto con película ACTIVA, BOPP o CONTROL. Hisopado y siembra de inóculo.

La Figura 3.3.6 muestra el número de colonias de *S. cerevisiae* por unidad de área (UFC/ cm<sup>2</sup>) presentes en la superficie de queso en el área CONTROL, BOPP y en contacto con la película ACTIVA, respectivamente.



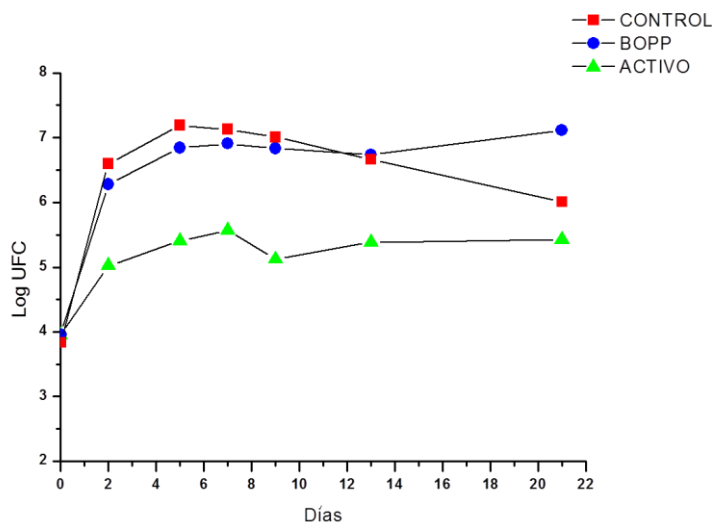
**Figura 3.3.6.** UFC/cm<sup>2</sup> en función del tiempo de almacenamiento para *S. cerevisiae* presentes en superficies de queso recubiertas con: película de BOPP comercial (Azul), sin recubrir (Rojo) y película ACTIVA (Verde).

En la figura 3.3.6 se observa que en los primeros 13 días de almacenamiento, el área en contacto con la película de BOPP presenta un menor número de levaduras en comparación con el área CONTROL del queso. Este efecto inhibitorio, impartido por la película plástica sin modificar, sería el resultado de la combinación de dos factores: uno es la restricción mecánica que soportan las células de *S. cerevisiae* en presencia de la película de BOPP. Y el otro es la menor disponibilidad de oxígeno en el área en contacto con la superficie de BOPP, en comparación al área CONTROL. Esta baja disponibilidad de oxígeno tiene como consecuencia un menor rendimiento en el uso de energía por parte de las células de levaduras y por lo tanto, una disminución en su desarrollo (Tотора 2007). Este efecto inhibitorio se evidenció hasta el día 13 de almacenamiento, en donde la carga de *S. cerevisiae* en la superficie del alimento, es igualada a la carga CONTROL. En ambos casos, el recuento del número de levaduras se incrementó en los primeros días de almacenamiento (fase exponencial): hasta el día 5 para el área CONTROL y hasta el día 7 para la superficie de queso en contacto con BOPP, registrándose una carga de  $1 \cdot 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> y  $5 \cdot 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Luego de este tiempo, el número de levaduras disminuyó notablemente en ambos casos (fase de declive o muerte), probablemente debido a que los productos metabólicos de los microorganismos alcanzaron valores de concentración tóxicas para las mismas células, limitando así su desarrollo (Richard, Derek, and Mark 2003). Esta diferencia de tiempo en que los microorganismos comenzaron a autolimitarse, también refleja el efecto inhibitorio inherente de la película comercial dispuesta sobre la superficie del queso.

En relación a las superficies de queso que estuvieron en contacto con las películas ACTIVAS, el efecto inhibitorio fue notablemente superior al observado con la película comercial. Además, este efecto fue sostenido en la totalidad de los 21 días de almacenamiento del alimento (Figura 3.3.6). Cabe aclarar que la inhibición observada por parte de las películas ACTIVAS en estas condiciones, no representó un efecto fungicida, ya que el número de levaduras determinado tras la aplicación de las películas, se incrementó levemente en relación a la carga inicial de levaduras presentes en la superficie de queso.

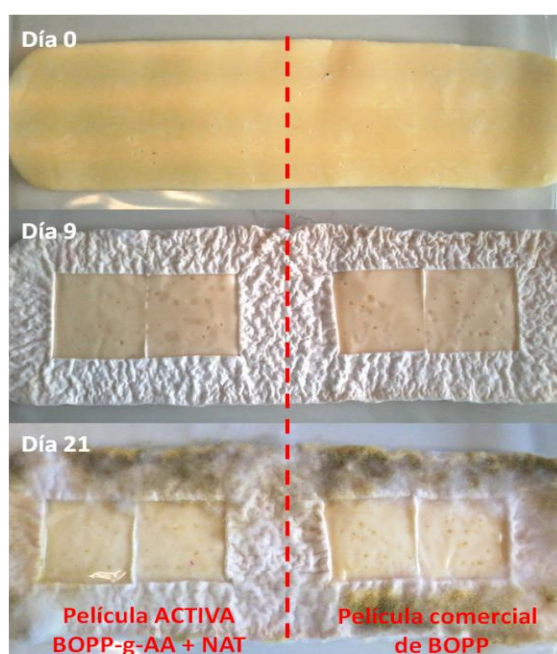
Para analizar las diferencias encontradas en términos de capacidad antimicrobiana y así evaluar el poder antifúngico de las películas activas, en la Figura 3.3.7 se presentan los valores de Log UFC en función del tiempo de almacenamiento.

Se observa que las películas ACTIVAS, a la semana de estar el queso almacenado a temperatura ambiente, generaron en la carga de levaduras, una reducción logarítmica de 1,6 unidades con respecto a la superficie CONTROL. Es decir que en estas condiciones, luego de siete días de su aplicación, las películas activas desarrolladas fueron capaces de inhibir hasta un 97,5 % de las levaduras presentes en la superficie del queso. Por otro lado, si bien se señaló que hubo cierto grado de inhibición debido a la aplicación de la película comercial de BOPP en la superficie del queso inoculado, la reducción logarítmica producida por esta, fue muy baja (0,3 log). Por lo cual, en términos de efectividad antimicrobiana, existe una diferencia poco significativa entre la muestra cubierta con la película comercial y la muestra control. Esta capacidad de conservación por parte de las películas activas, en comparación a las películas comerciales, fue sostenida prácticamente en todo el periodo de almacenamiento, ya que luego de 21 días, estas superficies fueron capaces de inhibir un 96,8% (1,5 log) de las levaduras presentes en la superficie de queso.



**Figura 3.3.7.** Log UFC vs tiempo de almacenamiento de *S. cerevisiae* presentes en superficies de queso recubiertas con: película de BOPP comercial (Azul), sin recubrir (Rojo) y película ACTIVA (Verde).

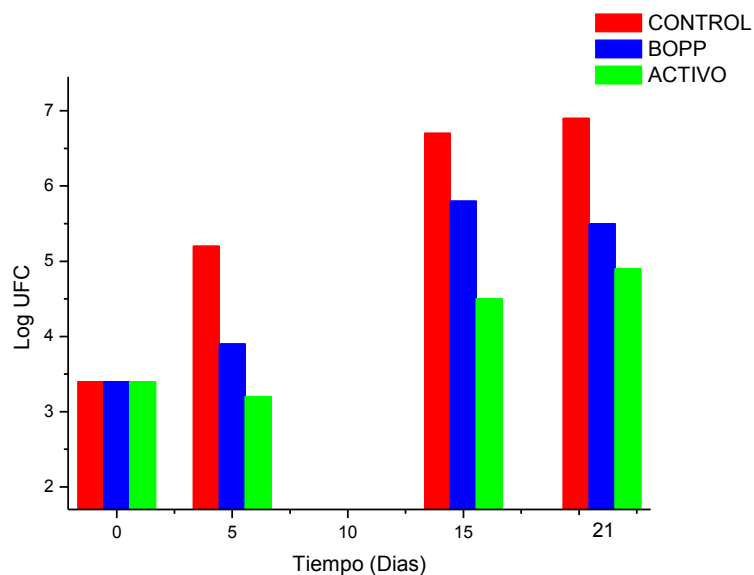
En la Figura 3.3.8, se muestra la imagen de una superficie de queso, en la cual durante todo el periodo de almacenamiento, un sector estuvo en contacto con la película activa (BOPP-g-AA + NAT) y otro sector en contacto con la película de BOPP comercial. En esta imagen se observa que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, en los sectores sin recubrir con las películas plásticas hubo un notable desarrollo de los mohos inoculados en la superficie. Por otro lado, en los sectores en contacto con las películas poliméricas, la simple inspección visual sugiere, equivocadamente, que el crecimiento del hongo ha sido inhibido en ambos casos por igual.



**Figura 3.3.8.** Comparación visual del desarrollo de hongos en la superficie de queso en contacto con película ACTIVA y película comercial de BOPP.

A partir del análisis realizado con respecto a la inhibición de la flora fúngica, resulta evidente que la inspección visual de las superficies del queso, no es suficiente para describir en su totalidad el efecto inhibitorio impartido por las películas activas ó las películas comerciales de BOPP. Por esta razón, es que el ensayo microbiológico cuantitativo de la superficie del alimento, fue un ensayo indispensable para conocer el desempeño de cada una de las películas poliméricas.

El recuento de *A. niger* presentes en la superficie del alimento, fue obtenido de los ensayos microbiológicos realizados para los días 0, 5, 15, y 21 de almacenamiento a temperatura ambiente. En la Figura 3.3.9 se muestra el número de colonias de *A. niger* expresado en Log UFC, para cada superficie del queso en el periodo de almacenamiento evaluado. Cabe aclarar, que al igual que para *S. cerevisiae*, la carga inicial de *A. niger* en la superficie del queso corresponde a los recuentos del día 0.



**Figura 3.3.9.** Log UFC de *A. niger* en superficie de queso en contacto con película ACTIVA, BOPP comercial y el CONTROL).

De los resultados mostrados en la figura, se desprende que a partir del día 5 y en la totalidad del periodo de almacenamiento (21 días), en la superficie de queso en contacto con la película ACTIVA, hubo una reducción logarítmica de 2 unidades con respecto al CONTROL, lo que representa una inhibición del 99% de los mohos presentes en superficie. Además, se registró una leve acción fungicida en los primeros 5 días de contacto. Por su parte, la carga fúngica en el queso recubierto por la película comercial de BOPP, sufrió una reducción logarítmica que no superó las 1,4 unidades logarítmicas, en relación a la superficie de queso CONTROL.

Las superficies de BOPP comercial al estar en íntimo contacto con la del alimento, no permiten la formación y maduración de los conidióforos del hongo y por lo tanto de



sus esporas. Estas estructuras son las responsables, entre otras cosas, del mal aspecto de un alimento en el cual se han desarrollado mohos en su superficie. Sin embargo, la germinación y el desarrollo polarizado de una red de hifas en toda la superficie del alimento y por debajo de la película plástica, se lleva a cabo de manera acelerada. Estas estructuras, también son capaces de generar las micotoxinas necesarias para su crecimiento y desarrollo. Es decir, la aplicación de la película plástica comercial dificulta mecánicamente una de las etapas del ciclo biológico de los hongos, impidiendo en este caso su desarrollo fructificado, pero no evita la formación de hifas vegetativas capaces de poner en peligro la seguridad del alimento.

En las películas ACTIVAS, sin embargo, además de la componente mecánica en cuanto a la inhibición, la presencia de NAT juega un papel fundamental en las propiedades antimicrobianas de dichas superficies. Los resultados obtenidos sugieren que en la superficie del queso se ha inhibido no únicamente el desarrollo de la estructura fructificada del moho, sino también la red microscópica que éste puede formar entre la superficie del queso y la película plástica.

La NAT actúa uniéndose al ergosterol presente en las membranas celulares de los hongos, logrando disminuir su concentración, sin modificar la permeabilidad de la membrana. Esto impacta en la formación de capas de ergosterol, anulando el ensamble de las paredes celulares y consecuentemente impidiendo la germinación de los tubos polarizados de formación de hongos y conidios (Leeuwen et al. 2013; Welscher et al. 2008). Por lo tanto, esta sumatoria de efectos mecánicos y antifúngicos de las películas activas, consigue que en la superficie del queso fresco se inhiba eficientemente el desarrollo de mohos y también de levaduras.

La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características, que junto con las nutricionales, organolépticas y comerciales, componen la calidad de los alimentos (OMS; 2007). La diferencia en la efectividad de inhibición que existe entre las películas de BOPP-*g*-AA + NAT y las películas de BOPP comercial, muestra la divergencia entre un material con posible aplicación de envase activo y un material con propiedades únicamente de barrera, que es comúnmente empleado como envase tradicional. El uso de

las películas activas desarrolladas en este trabajo, supone una buena estrategia para asegurar la calidad del alimento, garantizando su inocuidad y conservación de propiedades organolépticas.

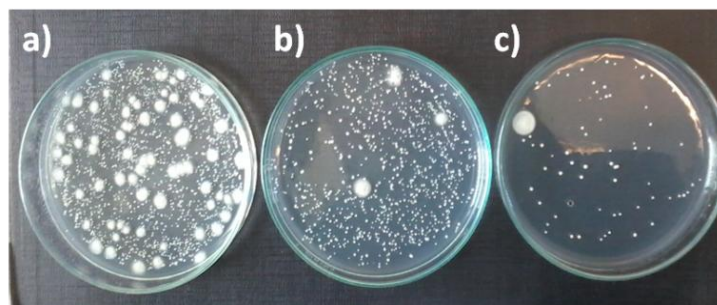
En el caso particular de los mohos, su presencia en el queso es indeseable debido a que además de poder influenciar en sus propiedades organolépticas, pueden producir micotoxinas que representen un riesgo para la salud (Torkar and Vengušt 2008).

En la Figura 3.3.10 se muestra la prevención del crecimiento de mohos naturales de la superficie de queso fresco, después de 21 días de almacenamiento en contacto con una película activa desarrollada en esta Tesis.



**Figura 3.3.10.** Inhibición de mohos en la superficie de queso fresco en contacto con película ACTIVA (BOPP- g- AA + NAT).

Las diferencias obtenidas para las muestras CONTROL, BOPP y ACTIVA se observaron claramente en los recuentos de flora fúngica realizados en placa, correspondientes a cada superficie. Estos son obviamente el reflejo de las capacidades inhibitorias de cada uno de los sistemas estudiados (Figura 3.3.11).

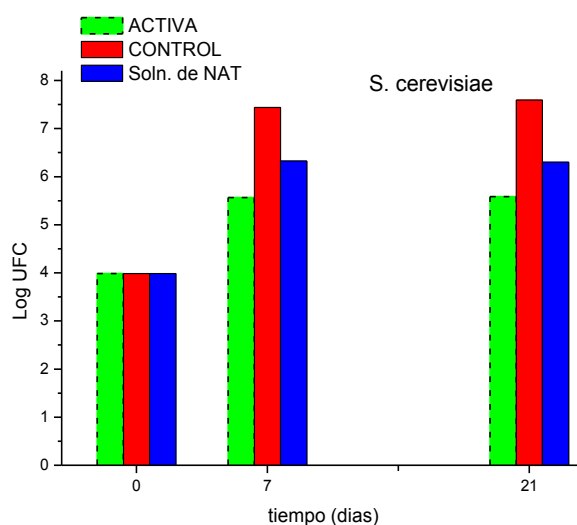


**Figura 3.3.11.** Recuento de mohos y levaduras presentes en superficie de queso a) CONTROL, b) BOPP, c) ACTIVA en el día 5 de almacenamiento.

Comparación del efecto antimicrobiano entre la aplicación directa de NAT en suspensión y la aplicación de las películas de BOPP-g-AA+NAT.

En quesos, la NAT puede ser aplicada en forma de aspersión sobre hormas, trozos, fetas, en forma de pinturas para coberturas o junto con anti-apelmazantes para su uso en queso rallado. Además puede ser empleada en otros alimentos donde específicamente, a través de la autoridad sanitaria nacional, se permita su uso como sustancia antifúngica (CAA; 2014).

A los fines comparativos, una suspensión de NAT (300 mg/L), se aplicó en una superficie de queso sin recubrir. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis microbiológico de la superficie de queso para conocer el número de *S. cerevisiae* presentes (Figura 3.3.12). Cabe destacar que la concentración de agente antifúngico utilizada, fue la recomendada por distribuidores del antimicrobiano y productores de alimentos lácteos. Además, es la establecida por la FDA para su aplicación sobre la superficie de quesos y otros derivados (FDA, 72.155,1994).



**Figura 3.3.12.** Log UFC vs tiempo de almacenamiento para superficie de queso en contacto con película ACTIVA; superficie CONTROL y superficie pintada con suspensión de NAT (300 ppm).

Los datos mostrados en la Figura 3.3.12 indican que después de una semana de almacenamiento a temperatura ambiente, durante todo el periodo de tiempo evaluado y con respecto al control, la NAT aplicada en forma de suspensión sobre la superficie del alimento, produjo una reducción logarítmica entre 1 y 1,3 unidades. Con el uso de las películas activas, en cambio, se registraron reducciones superiores a 1,5 unidades en el mismo periodo. De hecho, estudios adicionales realizados en muestras de queso fresco a temperatura ambiente y sin inocular, arrojaron resultados promisorios en cuanto a la utilización de estas películas, como envases que consiguen prolongar el tiempo de vida útil del alimento, ya que fueron capaces de inhibir en un 90% el número de mohos y levaduras luego de 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

*Cuantificación de residuos de NAT en muestra de alimento en contacto con películas BOPP-g-AA + NAT.*

A pesar del manejo que actualmente se le da a la NAT, su aplicación de manera directa al alimento puede presentar limitaciones en los beneficios que brinda. Esta puede sufrir pérdida de actividad, interactuar con otros aditivos o componentes naturales del alimento, migrar al interior del alimento, disminuir su concentración efectiva en la superficie, etc. (Ollé Resa, Jagus, and Gerschenson 2014).

Sin embargo, una de las consecuencias de la aplicación directa del antimicrobiano y que reviste mayor atención, es el minucioso control de los límites específicos de aceptación de dicho compuesto. Para esto, la autoridad regulatoria vigente, en nuestro caso la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnológica Médica (ANMAT), a través del C.A.A., establece las restricciones de uso de aditivos alimentarios y otras sustancias, entre ellas la NAT.

Con el objetivo de conocer la concentración de residuos de NAT en el alimento, luego de que este haya estado en contacto con las películas activas y se haya registrado un efecto de conservación en el mismo, se aplicó una metodología analítica en concordancia con el marco regulatorio vigente. La metodología empleada siguió los lineamientos de la norma **ISO 9233-1:2007 (IDF 140-2: 2007)** "*Cheese, cheese rind and processed cheese -- Determination of natamycin content*". En líneas generales, esta técnica

permite determinar cuantitativamente NAT en una porción de queso de 5 mm de espesor, a través de la extracción con MeOH y H<sub>2</sub>O, seguida de la cuantificación mediante espectrofotometría UV- Visible.

Para la cuantificación de residuos de NAT en la matriz alimenticia, se escogió una muestra de queso que permaneció en contacto con una película de BOPP-g-AA (2,5%G) + NAT durante 13 días de almacenamiento a temperatura ambiente. El análisis fue llevado a cabo luego de dicho periodo de tiempo, ya que en los estudios de inhibición de mohos y levaduras, se consideró que aproximadamente después de la segunda semana de contacto, la película activa logró su máxima capacidad de conservación sobre la superficie del alimento (Figura 3.3.7).

La totalidad de la superficie de queso en contacto con la película activa, fue removida y procesada según la metodología mencionada (Figura 3.3.13). Estudios realizados adicionalmente, acerca de la eficiencia de recuperación de NAT por el uso de esta técnica, arrojaron porcentajes de recuperación de aproximadamente un 99 %.



**Figura 3.3.13.** Porción de queso analizada para la cuantificación de NAT.

El CAA (Res 19, 30.01.95), define a la NAT como un conservante antimicrobiano permitido para el tratamiento de cáscaras de queso y de envolturas de embutidos secos que deban sufrir proceso de maduración. En esta resolución se establece que la concentración residual de este compuesto no debe ser mayor a 1 mg/dm<sup>2</sup> de superficie de queso o embutido (CAA; 2010). Según la metodología empleada en el presente trabajo, la concentración residual de NAT presente en el queso, luego de 13 días de almacenamiento, fue de 0,077 mg/dm<sup>2</sup>, es decir trece veces menor al límite permitido. Este resultado, sin lugar a dudas refleja lo ventajoso del uso de este tipo de sistemas, que incluso a bajas concentraciones del agente antifúngico, son capaces de optimizar la acción conservante

de la NAT y consecuentemente reducir los riesgos y efectos indeseados asociados a la ingesta de este u otros compuestos comúnmente utilizados en la industria alimenticia.

### **3.3.3. Valoración de los resultados obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas.**

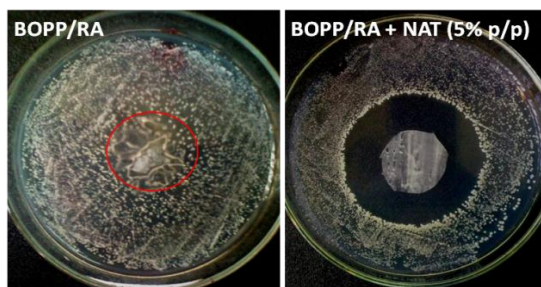
Las técnicas de conservación de los alimentos tienen como principal objetivo la preservación de la calidad de los alimentos. Durante su almacenamiento, los productos alimenticios experimentan mayores o menores modificaciones, tanto en su composición como en su calidad. La velocidad y características de estos procesos de deterioro dependen, además de su composición, en gran medida de las condiciones en que son resguardados (Gemeil 2006). Como se mencionó anteriormente, las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo (temperatura de almacenamiento, tiempo y carga microbiana en superficie), son condiciones que indudablemente influyen en la caducidad de esta clase de alimentos. Sin embargo, permitieron evaluar el notable desempeño de las películas ACTIVAS de BOPP-*g*-AA + NAT, frente a la presencia de mohos y levaduras en la superficie de queso fresco.

Desde este punto de vista, es de esperar que los resultados obtenidos en cuanto a la inhibición por parte de las películas desarrolladas, sean notablemente superiores cuando el uso de estos dispositivos sea llevado a cabo en condiciones que preserven la calidad higiénica, sanitaria y sensorial de los productos. Es decir, en condiciones que reduzcan o inhiban el crecimiento de microorganismos (por ejemplo, almacenamiento en refrigeración o congelación). En estos casos, la sumatoria de ambas estrategias de conservación aseguraría un incremento en el tiempo de vida útil del alimento. Además, brindaría la posibilidad de disminuir la cantidad necesaria de NAT inmovilizada en las superficies de BOPP-*g*-AA y por lo tanto implicaría la posibilidad de generar menores grados de modificación o injerto en el polímero. Al mismo tiempo, también se disminuiría la concentración de residuos de NAT en la superficie del alimento, con las ventajas normativas y de *marketing* que esto significa. Por último, todo esto implicaría una reducción de los costos asociados a la producción y aplicación de este tipo de envases activos para alimentos.

### 3.3.4 Prueba de la efectividad antimicrobiana de películas con recubrimiento activo, BOPP/RA + NAT.

En la sección 3.2, conjuntamente con el desarrollo de las películas de BOPP injertadas con AA y NAT inmovilizada, se expuso también la obtención de películas activas a base del recubrimiento de BOPP comercial, con una mezcla de NAT y poli(metacrilato de metilo). Estas superficies, mostraron una eficiente actividad antimicrobiana frente a *S. cerevisiae*, incluso en reiterados ensayos de difusión en placa (3.2.3).

En esta ocasión, en la Figura 3.3.14, se muestra la inhibición total del crecimiento de hongos por parte de una película de BOPP/RA+ NAT (5% p/p) en contacto con la superficie del agar. Allí también se muestra cómo la película control de BOPP/RA, es decir, sin NAT en el barniz polimérico, no posee efecto antimicrobiano frente a los microorganismos de la superficie. Estas imágenes, ponen de manifiesto el hecho de que al estar en contacto la película activa con la superficie del agar, la NAT es capaz de abandonar la resina polimérica que recubre el BOPP, y ejercer su poder antifúngico sobre los hongos presentes en la superficie.

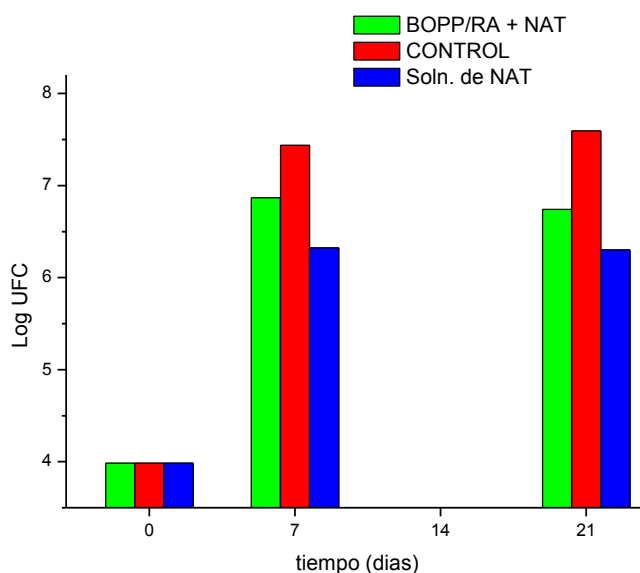


**Figura 3.3.14.** Ensayo de difusión en placa frente a *S. cerevisiae* de BOPP/RA (CONTROL) y BOPP/RA + NAT, 5% p/p.

Debido a su posible migración, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, todas las sustancias antimicrobianas utilizadas en el desarrollo de envases activos, deben ser aptas para su uso en alimentos. Ácido sórbico, ácido benzoico, ácido propiónico, nisina y otros compuestos, son algunos ejemplos de sustancias con diferente actividad antimicrobiana, que han sido incorporadas a películas plásticas para la elaboración de

envases activos (Silveira et al. 2007). La NAT, al ser un aditivo alimentario autorizado para su uso en alimentos, necesita ser regulada en cuanto a los límites de concentración en la superficie alimentaria.

Para evaluar la efectividad antimicrobiana de las películas de BOPP/RA +NAT en matrices reales, más precisamente en una superficie de queso, se procedió de manera similar a la expuesta para las películas de BOPP-*g*-AA + NAT. A diferencia del ensayo anterior, en este caso se evaluó únicamente el efecto inhibitorio sobre *S. cerevisiae*. Dicho efecto, fue comparado con el generado sobre una superficie de queso pintada con una suspensión de NAT (300 mg/L) y el correspondiente control. El número de levaduras presentes en la superficie del alimento, fue determinado mediante la técnica de hisopado y monitoreado en función del tiempo de almacenamiento (0, 7 y 21 días) a temperatura ambiente (23±2 °C) (Figura 3.3.15).

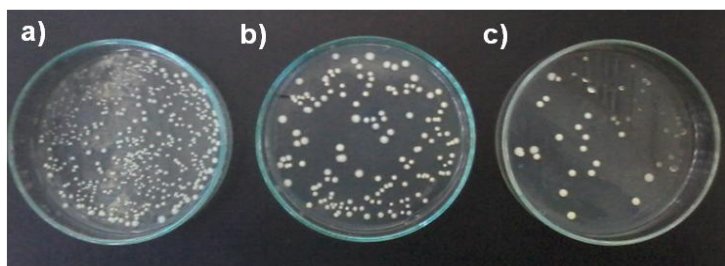


**Figura 3.3.15.** LogUFC de *S. cerevisiae* en función del tiempo de almacenamiento.

De la Figura 3.3.15 se desprende que la inhibición de *S. cerevisiae* en la superficie de queso fresco en contacto con la película de BOPP/RA+ NAT, tuvo lugar durante los 21 días de almacenamiento a 23° C. Luego de tres semanas de almacenamiento, el recuento de levaduras en la superficie de queso recubierta con la película activa, se redujo en 0,9 unidades logarítmicas respecto a la muestra control, este efecto inhibitorio resultó ser



inferior al observado en la superficie de queso pintada con la suspensión de NAT. La Figura 3.3.16 muestra los recuentos en placa obtenidos para este ensayo.

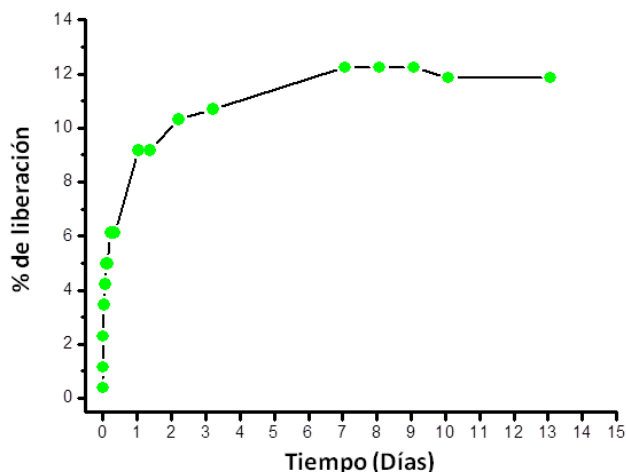


**Figura 3.3.16.** Recuento de levaduras presentes en superficie de queso a) CONTROL, b) BOPP/RA+ NAT c) pintado con solución de NAT 300 mg/L.

El menor grado de inhibición por parte de las películas recubiertas en relación a la superficie de queso pintada con NAT, probablemente fue debido a un bajo coeficiente de difusión del compuesto en la resina polimérica, cuando esta fue puesta en contacto con la superficie del queso. En consecuencia, la NAT liberada a la superficie del alimento, no fue suficiente para superar los efectos antifúngicos observados en la región pintada con la suspensión de NAT. Por el contrario, cuando la matriz polimérica es puesta en contacto con un medio termodinámicamente favorable, el coeficiente de difusión se incrementa y por lo tanto se lleva a cabo la difusión del compuesto (Mastromatteo et al. 2010). Este último caso, corresponde a los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos realizados en medios de cultivo, donde hubo una inhibición total de la flora fúngica y una gran difusión de NAT en el agar (Figura 3.3.14).

La liberación de NAT en agua por parte de las películas BOPP/RA+ NAT en función del tiempo, es representada en la Figura 3.3.17. Los resultados indican que la máxima cantidad de NAT liberada por estas superficies fue de  $0,045 \text{ mg/dm}^2$ , lo que representa solo el 12,5% del total de NAT presente en el recubrimiento. La cantidad de NAT liberada al medio líquido, fue menor que el determinado en la superficie de queso que estuvo en contacto con las películas de BOPP-g-AA + NAT (3.3.2.). Esto se debe a que la difusión de la NAT en las películas activas recubiertas, se encuentra regulada por la capa de polimetacrilato de metilo que actúa como barrera. En cambio en las superficies BOPP-g-AA + NAT, el tipo de interacción que existe entre el polímero y el agente antifúngico

(interacción electrostática, Van der Waals, oclusión, etc.), facilita la difusión de la NAT cuando las películas son puestas en contacto con un medio acuoso.



**Figura 3.3.17.** Liberación de NAT de películas recubiertas BOPP/RA + NAT en H<sub>2</sub>O.

Para conocer la liberación del antifúngico en la superficie del queso, tras la aplicación de las películas activas de BOPP/RA+ NAT, se monitoreó la cantidad de NAT remanente en el recubrimiento o “coating” en diferentes periodos del tiempo de almacenamiento. En este ensayo, la resina polimérica fue disuelta en ácido acético y cuantificada la NAT mediante espectrofotometría UV- Visible. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.3.1, donde se evidencia que luego de estar en contacto la película con el queso por 21 días, no hubo modificaciones apreciables en la cantidad de NAT presentes en el *coating*.

Día	0	7	21
NAT remanente	39 ±2 µg	40 ±2 µg	41 ±2 µg

**Tabla 3.3.1.** Cuantificación de NAT remanente en película de BOPP/RA + NAT, en contacto con superficie de queso a los 0,7 y 21 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos demuestran que la liberación de la NAT en la matriz de un alimento graso, no se lleva a cabo de igual forma que en una matriz predominantemente

acuosa. Las condiciones encontradas en los sistemas con elevado contenido de agua, favorecen la difusión del compuesto activo a través del recubrimiento polimérico, el cual sirve de “regulador” de la transferencia de masa del compuesto activo (Quintavalla and Vicini 2002). Se estima que el uso de las películas BOPP/RA+ NAT en alimentos con elevada  $a_w$  como ser jugos, yogures, quesos blandos, entre otros, podría contribuir eficientemente en el incremento del tiempo de vida útil de estos alimentos, regulando de manera gradual la concentración de antifúngico presente en el alimento.

### 3.3.5 Conclusiones parciales

En esta sección se evaluó las propiedades antimicrobianas de las películas desarrolladas de BOPP-*g*-AA + NAT y BOPP/RA + NAT en matrices reales de alimento, específicamente, queso fresco. El efecto inhibitorio de estos sistemas fue estudiado frente a *A. niger* y *S. cerevisiae*, que son habitualmente microorganismos contaminantes de la superficie de estos alimentos a la hora de su manufactura.

Las películas de BOPP-*g*-AA + NAT al estar en contacto con la superficie de queso inoculado, mostraron una eficiente actividad antifúngica, reduciendo en no menos de 96,8% la carga de *S. cerevisiae* y 99% la de *A. niger*. Este efecto inhibitorio, fue sostenido en un periodo de almacenamiento de 21 días a temperatura ambiente. Además, estas películas superaron los efectos de inhibición propios de las películas comerciales de BOPP, que fueron capaces de evitar la formación de colonias fructificadas de mohos, pero no de inhibir el crecimiento de las hifas microscópicas del microorganismo y el desarrollo de levaduras por debajo de la película. Esto marca la clara diferencia entre las películas desarrolladas, útiles como envases bioactivos y las películas comerciales con propiedades únicamente de barrera, típicas de un envase tradicional.

Comúnmente, al igual que otros agentes antimicrobianos empleados en alimentos, la NAT es directamente aplicada en polvo o en suspensión sobre la superficie del queso, poniendo en riesgo la seguridad química del producto y la eficiencia del antifúngico. En este trabajo, se comparó el efecto antimicrobiano generado en una superficie de queso, sobre la cual el antimicótico fue aplicado directamente en forma de suspensión. En estas áreas del alimento, se encontró incluso una inhibición menor a la obtenida mediante el

uso de las películas activas de BOPP-*g*-AA + NAT, quedando así expuesto el eficiente uso de la NAT inmovilizada en las películas modificadas y la posibilidad de disminuir la cantidad de antimicrobiano necesario para conservar el alimento. En relación a esto último, los ensayos realizados según métodos oficiales para la cuantificación de NAT en queso, luego de estar el alimento en contacto 13 días con las películas activas, arrojaron valores residuales de hasta un orden de magnitud menor, en comparación a los límites permitidos según la normativa vigente (CAA).

Las películas con recubrimiento antimicrobiano (BOPP/RA + NAT) fueron capaces de inhibir el crecimiento de levaduras sobre la superficie del queso en contacto (aproximadamente en un 90%) a través de la transferencia de NAT. El grado de migración del agente antifúngico varió según el medio en contacto con la superficie polimérica, observándose que en medios de elevado contenido de agua, la difusión del agente activo se incrementó. Es por esto, que se estima que la aplicación de estos sistemas en alimentos de elevada  $a_w$ , cumplirían la función de envases activos antimicrobianos, capaces de mantener la concentración óptima de agente antifúngico en la superficie del alimento.

El conjunto de películas desarrolladas, reúne las características apropiadas para su aplicación como envases activos antimicrobianos. Su uso, combinado con las condiciones de almacenamiento o procesos que eviten el desarrollo de microorganismos (refrigeración, congelamiento, pre-cocción, etc.), son una estrategia prometedora para conseguir el principal objetivo de esta clase de tecnologías: mantener los pilares de calidad e incrementar el tiempo de vida útil del alimento envasado.

## **Capítulo 4: Conclusiones generales**



## 4.1 Conclusiones generales

Tradicionalmente se desea que el envasado de los alimentos sea capaz de mantener su calidad hasta el final de la etapa de distribución o hasta el momento del consumo del producto. Sin embargo, en la práctica la calidad de los alimentos se va deteriorando durante el periodo de almacenamiento, debido en parte a los procesos a los que es expuesto el alimento en el envasado y sobre todo debido a que los materiales tradicionales de envasado, no poseen la capacidad de satisfacer los requerimientos específicos de cada uno de alimentos a los que están destinados. En este contexto, la tecnología de los envases activos se presentó como una opción eficiente para atender a cada uno de los requerimientos críticos de los alimentos, mediante la interacción deliberada entre el envase o componentes del mismo, con el alimento o su entorno.

El objetivo principal de este trabajo de Tesis, fue la obtención y evaluación de películas plásticas que tuviesen el potencial para ser usadas como material de envases activos para alimentos y que específicamente sean capaces de inhibir o retardar el crecimiento de determinados microorganismos (mohos y levaduras), y de esta forma extender el tiempo de vida del alimento envasado, manteniendo la calidad del mismo.

El sustrato elegido para obtener esta clase de materiales antimicrobianos, fue el polipropileno biorientado (BOPP), el cual es comúnmente utilizado como materia prima para envases de un gran número de productos, en su mayoría alimenticios. Para brindarle a este material las propiedades específicas y necesarias para cumplir con el objetivo planteado, en un primer paso fue necesario llevar a cabo su modificación a nivel superficial. Para ello se aplicó una metodología sencilla de modificación química, que condujo a la obtención de películas de BOPP con grupos reactivos en la superficie, que posteriormente servirían como sitios de anclaje de la molécula orgánica antifúngica, natamicina (NAT). La técnica estuvo basada en el injerto de la superficie plástica con el monómero vinílico AA, a través del uso de radiación UV. Sobre esta metodología, se realizaron diferentes pruebas para llevar adelante la optimización de la reacción de injerto o *fotoinjerto*, modificando ciertos parámetros involucrados en el proceso. Como resultado se pudo establecer un conjunto de condiciones óptimas, que permitieron llevar a cabo la

funcionalización de las películas con buenos rendimientos y cumpliendo con las perspectivas programadas.

Debido a su fácil e inmediata posibilidad de industrialización, alternativamente a la técnica de fotoinjerto por radiación UV, se evaluó el uso de los métodos de activación superficial por tratamiento plasma y por descarga corona. Estas técnicas fueron utilizadas para generar en la superficie del material, especies reactivas capaces de iniciar el proceso de copolimerización de AA; dichas experiencias fueron llevadas a cabo en instalaciones industriales. Desafortunadamente, las limitaciones instrumentales y la poca flexibilidad de las actividades de la planta, impidieron que estas metodologías pudieran ser del todo adaptadas para cumplir con el propósito deseado. Sin embargo, el conocimiento adquirido del equipamiento y de los procesos asociados a estas técnicas de activación superficial, nos permitió desarrollar un criterio específico de cómo deberían ser empleadas estas técnicas, para lograr el objetivo deseado.

Las superficies modificadas por reacción de fotoinjerto, sirvieron como soporte del compuesto bioactivo NAT (BOPP-*g*-AA + NAT), el cual es ampliamente utilizado en la industria alimenticia como inhibidor del crecimiento de mohos y levaduras en productos lácteos y ciertos alimentos cárnicos de maduración. Este compuesto fue incorporado eficientemente a las superficies modificadas por injerto, mediante dos estrategias diferentes. Una de ellas implicó la unión covalente del antifúngico a los grupos carboxílicos de las cadenas injertadas, gracias al uso de un agente acoplante (DCC). La otra estrategia de inmovilización, fue a través de la interacción física de la NAT con las películas poliméricas a través de interacciones de tipo electrostática, Van der Waals y también a través de la retención del compuesto activo, debido a la morfología irregular de la superficie.

Las pruebas microbiológicas realizadas en medio de cultivo para este grupo de películas, demostraron que las superficies con NAT inmovilizada físicamente (BOPP-*g*-AA + NAT) fueron capaces de inhibir completamente el desarrollo de *S. cerevisiae* y *A. niger*. En tanto que las películas con el antifúngico unido covalentemente ([BOPP-*g*-AA]-NAT), no mostraron ser efectivas frente a la inhibición de estos microorganismos. Estos resultados,



sin lugar a duda motivaron a la elección de las películas BOPP-*g*-AA + NAT como los materiales con potencial aplicación de envases antimicrobianos. Además, por el sencillo proceso de obtención de estas superficies, se cree que sería una contribución favorable en el momento de una posible aplicación a mayor escala.

Otra opción utilizada en este trabajo de Tesis para brindarle a las superficies de BOPP propiedades antimicrobianas, fue a través de su recubrimiento con un barniz polimérico conteniendo el compuesto antifúngico. Las películas así obtenidas, demostraron ser notablemente eficientes a la hora de inhibir el desarrollo de levaduras en ensayos de difusión en placa. Además, en determinadas condiciones estas películas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* en repetidas aplicaciones de la misma superficie activa sobre la superficie del agar. Esto es muy significativo ya que denota el enorme potencial de estas películas para formar parte de envases antimicrobianos que puedan ser reutilizados en un alimento.

La evaluación final de las películas con comprobada actividad antimicrobiana, se realizó en una matriz real de alimento. La matriz seleccionada para llevar a cabo estas pruebas, fue un queso fresco. La superficie de esta clase de alimentos frecuentemente se ve contaminada con numerosas especies de mohos y levaduras, la mayoría indeseadas debido a que alteran sus propiedades organolépticas, pero también son capaces de poner en riesgo la seguridad del producto.

Los estudios microbiológicos realizados en el alimento, indicaron que la aplicación de las películas BOPP-*g*-AA + NAT sobre la superficie del queso, fueron capaces de inhibir desde un 96,8% la carga de *S. cerevisiae* y en no menos de un 99% la de *A. niger*, por un periodo de almacenamiento de 21 días a temperatura ambiente. Este notable efecto inhibitorio fue superior al comparado con el generado por la aplicación de películas BOPP sin modificar, comúnmente utilizadas como envase tradicional de estos alimentos y también fue superior al generado por la aplicación directa de la NAT en forma de suspensión sobre el alimento. Es por esto que la aplicación de las películas desarrolladas en este trabajo de Tesis sobre este tipo de matrices, se cree que es un aporte interesante

a las técnicas clásicas de conservación y envasado, cuyo principal objetivo es evitar el deterioro de los alimentos.

Una de las razones de utilizar estas películas como envases, es reducir la posibilidad de que los compuestos antimicrobianos que normalmente están en contacto con los alimentos, puedan migrar o ser transferidos al producto alimenticio. Para conocer el desempeño de las películas desarrolladas en esta Tesis con respecto a este punto, se determinó el contenido de NAT residual en muestras de queso que permanecieron en contacto con las películas activas y en donde se observó una notable acción antifúngica. Esta determinación se realizó mediante la aplicación de un método oficial (ISO 9233-1:2007).

Los resultados obtenidos indicaron que la cantidad de NAT presente en el alimento, luego de estar este en contacto un tiempo prolongado con las películas bioactivas, fue un orden de magnitud menor al establecido por la legislación vigente en nuestro país (C.A.A.) y el resto del mundo. Este resultado positivo, corrobora el comportamiento de las películas activas BOPP-*g*-AA + NAT en los ensayos de liberación del agente antifúngico en medios líquidos de baja polaridad (hexano).

Las diferencias existentes entre las películas comerciales, la aplicación directa del antifúngico sobre el alimento y las películas desarrolladas en este trabajo de Tesis, muestra claramente la divergencia entre un material con propiedades típicas de un envase tradicional (BOPP), la ineficiencia en algunos casos de la aplicación directa de agentes antimicrobianos (suspensión de NAT) y los beneficios conseguidos por el uso de un material antimicrobiano (BOP-*g*-AA + NAT) con potencial uso como envase activo.

Las películas con recubrimiento antimicrobiano (BOPP/RA:NAT), demostraron ser también muy eficientes a la hora de evitar el desarrollo de mohos y levaduras. Estas fueron capaces de inhibir aproximadamente un 90% el crecimiento de levaduras presentes en la superficie de un queso almacenado por 21 días a temperatura ambiente. Este efecto inhibitorio por parte de las películas recubiertas, se estima que podría ser notablemente superior en alimentos con mayor actividad de agua ( $a_w$ ), ya que se

comprobó que la transferencia del compuesto bioactivo desde la matriz polimérica a la superficie en contacto, se ve favorecida en medios con alto contenido acuoso.

La evaluación de la efectividad antimicrobiana de las películas desarrolladas en esta Tesis, en particular sobre la superficie del alimento, se llevó a cabo en condiciones extremas, las cuales son favorables para el desarrollo exacerbado de microorganismos en el alimento. Estas condiciones fueron utilizadas intencionalmente y permitieron evaluar la destacada capacidad bioactiva de las películas desarrolladas. Es entonces que se supone que esta capacidad se vería favorecida, si la aplicación de estas películas es acompañada por las condiciones de almacenamiento normales y/o recomendadas para esta clase de alimentos. De esta forma sería de esperar un mayor efecto antimicrobiano y por lo tanto un mejor efecto de conservación del producto.

## **Capítulo 5: Bibliografía**



## 5.1 Bibliografía

- Ahuja, Tarushee, Irfan Ahmad Mir, Devendra Kumar, and Rajesh. 2007. "Biomolecular Immobilization on Conducting Polymers for Biosensing Applications." *Biomaterials* 28(5): 791–805. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055573> (March 24, 2014).
- Appendini, Paola, and Joseph H. Hotchkiss. 2002a. "Review of Antimicrobial Food Packaging." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3(2): 113–26. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856402000127>.
- . 2002b. "Review of Antimicrobial Food Packaging." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3(2): 113–26. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856402000127>.
- ASTM D1746. 2003. *Standard Test Method for Transparency of Plastic Sheeting 1*.
- ASTM G21-96. 2002. *96 Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials To*.
- Atta, H.M., A.S. El-Sayed, M.a. El-Desoukey, M. Hassan, and M. El-Gazar. 2012. "Biochemical Studies on the Natamycin Antibiotic Produced by *Streptomyces Lydicus*: Fermentation, Extraction and Biological Activities." *Journal of Saudi Chemical Society*. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319610312000440> (January 3, 2014).
- Bhattacharya, A. 2004. "Grafting: a Versatile Means to Modify polymers Techniques, Factors and Applications." *Progress in Polymer Science* 29(8): 767–814. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967000400067X> (December 13, 2013).
- Bilongo, T. Goma, J.-C. Remigy, and M.J. Clifton. 2010. "Modification of Hollow Fibers by UV Surface Grafting." *Journal of Membrane Science* 364(1-2): 304–8. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037673881000654X> (March 7, 2014).
- Chiang, Yen-Che, Yung Chang, Akon Higuchi, Wen-Yih Chen, and Ruoh-Chyu Ruaan. 2009. "Sulfobetaine-Grafted Poly(vinylidene Fluoride) Ultrafiltration Membranes Exhibit Excellent Antifouling Property." *Journal of Membrane Science* 339(1-2): 151–59. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376738809003330> (July 16, 2014).
- Chinchilla, Rafael, David J Dodsworth, Carmen Na, and M Soriano. 2001. "Polymer-Bound N - Hydroxysuccinimide as a Solid-Supported Additive for DCC-Mediated Peptide Synthesis." *Tetrahedron Letters* 42: 4487– 4489.
- Coma, Véronique. 2008. "Bioactive Packaging Technologies for Extended Shelf Life of Meat-Based Products." *Meat science* 78(1-2): 90–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062099> (January 3, 2014).
- Costamagna, Vanina. 2006. "Tesis de Maestría En Ciencias Químicas." Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

- Dainelli, Dario, Nathalie Gontard, Dimitrios Spyropoulos, Esther Zondervan-van den Beuken, and Paul Tobback. 2008. "Active and Intelligent Food Packaging: Legal Aspects and Safety Concerns." *Trends in Food Science & Technology* 19: S103–S112.
- Dargaville, Tim R, Graeme a George, David J.T Hill, and Andrew K Whittaker. 2003. "High Energy Radiation Grafting of Fluoropolymers." *Progress in Polymer Science* 28(9): 1355–76. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670003000479> (July 16, 2014).
- Deng, J, L Wang, L Liu, and W Yang. 2009. "Developments and New Applications of UV-Induced Surface Graft Polymerizations." *Progress in Polymer Science* 34(2): 156–93. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670008000750> (December 15, 2013).
- Deng, Jianping, Lifu Wang, Lianying Liu, and Wantai Yang. 2008. "Developments and New Applications of UV-Induced Surface Graft Polymerizations." *Progress in Polymer Science* 34: 156–93.
- Dobrucka, Renata. 2013. "LogForum." 9(2): 103–10.
- Dorval Dion, C.a., and J.R. Tavares. 2013. "Photo-Initiated Chemical Vapor Deposition as a Scalable Particle Functionalization Technology (a Practical Review)." *Powder Technology* 239: 484–91. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591013001320> (March 6, 2014).
- Galvin, Casey J., and Jan Genzer. 2012. "Applications of Surface-Grafted Macromolecules Derived from Post-Polymerization Modification Reactions." *Progress in Polymer Science* 37(7): 871–906. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011001341> (May 1, 2014).
- García-Vargas, M, C González-Chomón, B Magariños, a Concheiro, C Alvarez-Lorenzo, and E Bucio. 2014. "Acrylic Polymer-Grafted Polypropylene Sutures for Covalent Immobilization or Reversible Adsorption of Vancomycin." *International journal of pharmaceuticals* 461(1-2): 286–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333904> (March 18, 2014).
- Gemeil, Msc. Ing. Raúl Sarroca González Dr. Ing. Manuel Torres. 2006. *Manipulación y Almacenamiento De*.
- Goddard, J M, and J H ã Hotchkiss. 2007. "Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds." *Progress in Polymer Science* 32: 698–725.
- Goddard, J.M., and J.H. Hotchkiss. 2007. "Polymer Surface Modification for the Attachment of Bioactive Compounds." *Progress in Polymer Science* 32(7): 698–725. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670007000512> (December 22, 2013).
- González, Agustín. 2013. "Materiales Poliméricos Biodegradables Para Ser Usados En Recubrimientos: Preparación Por Modificación de Materiales de Origen Natural." Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.
- Gupta, Bhuvanesh, Kumar Krishnanand, and B.L. Deopura. 2012. "Oxygen Plasma-Induced Graft Polymerization of Acrylic Acid on Polycaprolactone Monofilament." *European Polymer*

- Journal* 48(11): 1940–48. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305712002479> (January 20, 2014).
- Han, Jung H. 2005. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Science & Technology Books.
- . 2013. Plastic Films in Food Packaging *10 Antimicrobial Packaging Systems*. First Edit. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3112-1.00010-7>.
- Hanušová, Kristýna, Monika Šťastná, Lenka Votavová, Kamila Klaudivová, Jaroslav Dobiáš, Michal Voldřich, and Miroslav Marek. 2010. “Polymer Films Releasing Nisin And/or Natamycin from Polyvinylidene Chloride Lacquer Coating: Nisin and Natamycin Migration, Efficiency in Cheese Packaging.” *Journal of Food Engineering* 99(4): 491–96. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877410000506> (December 16, 2013).
- Hauser, Carolin, and Joachim Wunderlich. 2011. “Antimicrobial Packaging Films with a Sorbic Acid Based Coating.” *Procedia Food Science* 1(Icef 11): 197–202. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X11000320> (January 3, 2014).
- Helander, I M, E L Nurmiäho-Lassila, R Ahvenainen, J Rhoades, and S Roller. 2001. “Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria.” *International journal of food microbiology* 71(2-3): 235–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11789941>.
- Huang, Jingjing, and Weilin Xu. 2010. “Zwitterionic Monomer Graft Copolymerization onto Polyurethane Surface through a PEG Spacer.” *Applied Surface Science* 256(12): 3921–27. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433210000784> (July 11, 2014).
- Jarvis, Basil. 2008. *Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods*. Second edi. Amsterdam: Elsevier.
- Kalapat, Nanticha, and Taweechai Amornsakchai. 2012. “Surface Modification of Biaxially Oriented Polypropylene (BOPP) Film Using Acrylic Acid-Corona Treatment: Part I. Properties and Characterization of Treated Films.” *Surface and Coatings Technology* 207(2012): 594–601. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897212007712> (July 17, 2014).
- Kang, Inn-kyu, and Yong Kiel. 1996. “Preparation and Surface Characterization of Functional Group-Grafted and Hepk&-Immobilized Polyurethanes by Plasma Glow Discharge.” *Biomaterials* 17: 841–47.
- Kato, Koichi, Emiko Uchida, En-tang Kang, Yoshikimi Uyama, and Yoshito Ikada. 2003. “Polymer Surface with Graft Chains.” *Progress in Polymer Science* 28: 209–59.
- Kopper, Gisela, and Alejandro Ariosti. 2010. “Food Packaging Legislation : Sanitary Aspects.” In *Ensuring Global Food Safety*, Elsevier Inc., 227–61. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374845-4.00014-X>.



- Kumar, Radhesh, and Helmut Münstedt. 2005. "Silver Ion Release from Antimicrobial Polyamide/silver Composites." *Biomaterials* 26(14): 2081–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576182> (July 10, 2014).
- Lante, Anna, Tiziana Nardi, Federico Zocca, Alessio Giacomini, and Viviana Corich. 2011. "Evaluation of Red Chicory Extract as a Natural Antioxidant by Pure Lipid Oxidation and Yeast Oxidative Stress Response as Model Systems." *Journal of agricultural and food chemistry* 59(10): 5318–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488640>.
- Leeuwen, M R Van, P Krijgsheld, T T Wyatt, E A Golovina, H Menke, A Dekker, J Stark, H Stam, R Bleichrodt, and J Dijksterhuis. 2013. "Studies in Mycology." *Studies in Mycology* 74: 71–85.
- Lei, Jingxin, and Xia Liao. 2001. "Surface Graft Copolymerization of Acrylic Acid onto LDPE Film through Corona Discharge." *European Polymer Journal* 37: 771–79.
- Li, Z F, E T Kang, K G Neoh, and K L Tan. 1998. "Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on the Surface of Polyaniline Films Graft Copolymerized with Acrylic Acid." *Biomaterials* 19(1-3): 45–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9678849>.
- Martorell, Patricia, Josep Vicent Forment, Rosa de Llanos, Fernando Montón, Silvia Llopis, Nuria González, Salvador Genovés, Elena Cienfuegos, Honorato Monzó, and Daniel Ramón. 2011. "Use of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Caenorhabditis Elegans* as Model Organisms to Study the Effect of Cocoa Polyphenols in the Resistance to Oxidative Stress." *Journal of agricultural and food chemistry* 59(5): 2077–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288028>.
- Mastromatteo, Marcella, Marianna Mastromatteo, Amalia Conte, and Matteo Alessandro Del Nobile. 2010. "Advances in Controlled Release Devices for Food Packaging Applications." *Trends in Food Science & Technology* 21(12): 591–98. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224410001743> (January 3, 2014).
- Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente. 2013. *Estrategia " Más Alimento , Menos Desperdicio " Programa Para La Reducción de Las Pérdidas y El Desperdicio Alimentario y La Valorización De*. Madrid.
- Mohamed, Nasser H., Thomas Bahnert, Andreas Wego, Jochen S. Gutmann, and Mathias Ulbricht. 2012. "Surface Modification of Poly(ethylene Terephthalate) Fabric via Photo-Chemical Reaction of Dimethylaminopropyl Methacrylamide." *Applied Surface Science* 259: 261–69. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433212012032> (March 6, 2014).
- Muñoz-Bonilla, Alexandra, and Marta Fernández-García. 2012. "Polymeric Materials with Antimicrobial Activity." *Progress in Polymer Science* 37(2): 281–339. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011001079> (December 13, 2013).
- Muthukumarasamy, Parthiban, and Richard a Holley. 2007. "Survival of *Escherichia Coli* O157:H7 in Dry Fermented Sausages Containing Micro-Encapsulated Probiotic Lactic Acid Bacteria." *Food microbiology* 24(1): 82–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943098> (July 22, 2014).

- N. Tsubokawa, Hosoya, M, and J Kurumada. 1995. "Grafting Reaction of Surface Carboxyl Groups on Carbon Black with Polymers Having Terminal Hydroxyl or Amino Groups Using N , NI-Dicyclohexylcarbodiimide as a Condensing Agent." *Reactive & Functional Polymers* 27: 75–81.
- Oehr, C., M. Müller, B. Elkin, D. Hegemann, and U. Vohrer. 1999. "Plasma Grafting — a Method to Obtain Monofunctional Surfaces." *Surface and Coatings Technology* 116-119: 25–35. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897299002017> (July 17, 2014).
- Ollé Resa, Carolina P., Rosa J. Jagus, and Lía N. Gerschenson. 2014. "Natamycin Efficiency for Controlling Yeast Growth in Models Systems and on Cheese Surfaces." *Food Control* 35(1): 101–8. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003320> (January 3, 2014).
- Oyane A, Uchida M, Yokoyama Y, Choong C, Triffitt J, Ito A. Simple surface modification of poly(epsilon-capro- lactone) to induce its apatite-forming ability. *J Biomed Mater Res, Part A* 2005;75A:138–45.
- Oshima, Akihiro, Fumiya Shiraki, Hajime Fujita, and Masakazu Washio. 2011. "Surface Modification of Polymeric Materials Using Ultra Low Energy Electron Beam Irradiation." *Radiation Physics and Chemistry* 80(2): 196–200. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969806X1000321X> (July 17, 2014).
- Quintavalla, Stefania, and Loredana Vicini. 2002. "Antimicrobial Food Packaging in Meat Industry." *Meat science* 62(3): 373–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061613>.
- Ragoubi, M., B. George, S. Molina, D. Bienaimé, a. Merlin, J.-M. Hiver, and a. Dahoun. 2012. "Effect of Corona Discharge Treatment on Mechanical and Thermal Properties of Composites Based on Miscanthus Fibres and Polylactic Acid or Polypropylene Matrix." *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 43(4): 675–85. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359835X12000024> (July 16, 2014).
- Ragoubi, Mohamed, David Bienaimé, Stéphane Molina, Béatrice George, and André Merlin. 2010. "Impact of Corona Treated Hemp Fibres onto Mechanical Properties of Polypropylene Composites Made Thereof." *Industrial Crops and Products* 31(2): 344–49. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669009002398> (July 29, 2014).
- Rajajeyaganthan, Ramanathan, Felipe Kessler, Pedro Henrique, De Moura Leal, and Daniel Eduardo Weibel. 2011. "Surface Modification of Synthetic Polymers Using UV Photochemistry in the Presence of Reactive Vapours." 175–82.
- Ranby, B, W T Yang, and O Tretinnikov. 1999. "Surface Photografting of Polymer Fibers, Films and Sheets." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 151: 301–5.
- Ratner, Buddy D, and Allan S Hoffman. 2013. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* *Biomaterials Science. 3° Edition*. Third Edit. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00027-9>.

- Restuccia, Donatella, U. Gianfranco Spizzirri, Ortensia I. Parisi, Giuseppe Cirillo, Manuela Curcio, Francesca Iemma, Francesco Puoci, Giuliana Vinci, and Nevio Picci. 2010. "New EU Regulation Aspects and Global Market of Active and Intelligent Packaging for Food Industry Applications." *Food Control* 21(11): 1425–35.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510001490> (January 3, 2014).
- Richard, Coles, McDowell Derek, and Kirwan Mark. 2003. *Food Packaging Technology*. 1st ed. Blackwell Publishing Ltd asdasd.
- Richey, T, H Iwata, H Oowaki, E Uchida, S Matsuda, and Y Ikada. 2000a. "Surface Modification of Polyethylene Balloon Catheters for Local Drug Delivery." *Biomaterials* 21: 1057–65.
- . 2000b. "Surface Modification of Polyethylene Balloon Catheters for Local Drug Delivery." *Biomaterials* 21: 1057–65.
- Sciarratta, V, U Vohrer, D Hegemann, M Muller, and C Oehr. 2003. "Plasma Functionalization of Polypropylene with Acrylic Acid." *Surface and Coatings Technology* 175: 805–10.
- Silveira, M.F.a., N.F.F. Soares, R.M. Geraldine, N.J. Andrade, D.a. Botrel, and M.P.J. Gonçalves. 2007. "Active Film Incorporated with Sorbic Acid on Pastry Dough Conservation." *Food Control* 18(9): 1063–67. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506001848> (January 3, 2014).
- Silvestre, Clara, Donatella Duraccio, and Sossio Cimmino. 2011. "Food Packaging Based on Polymer Nanomaterials." *Progress in Polymer Science* 36(12): 1766–82.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670011000311> (December 11, 2013).
- Standar Japanese. 2000. 2000 *JIS Z 2801*.
- Su, Yang, Quanlong Li, Shentong Li, Meihan Dan, Fei Huo, and Wangqing Zhang. 2014. "Doubly Thermo-Responsive Brush-Linear Diblock Copolymers and Formation of Core-Shell-Corona Micelles." *Polymer* 55(8): 1955–63.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003238611400175X> (July 29, 2014).
- Suloff, Eric C. 1999. "Comparative Study of Semisynthetic Derivate of Natamycin and the Paren Antibiotic on the Spoilage of Shreddedcheddar Cheese." Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Sun, Jie, Lan Yao, Zhiqiang Gao, Shujing Peng, Chunxia Wang, and Yiping Qiu. 2010. "Surface Modification of PET Films by Atmospheric Pressure Plasma-Induced Acrylic Acid Inverse Emulsion Graft Polymerization." *Surface and Coatings Technology* 204(24): 4101–6.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0257897210004020> (January 3, 2014).
- Torkar, K. Godič, and a. Vengušt. 2008. "The Presence of Yeasts, Moulds and Aflatoxin M1 in Raw Milk and Cheese in Slovenia." *Food Control* 19(6): 570–77.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507001296> (December 24, 2013).

Vermeiren, L., F. Devlieghere, M. van Beest, N. de Kruijf, and J. Debevere. 1999. "Developments in the Active Packaging of Foods." *Trends in Food Science & Technology* 10(3): 77–86. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224499000321>.

Wang, Chen, and Jie-Rong Chen. 2007. "Studies on Surface Graft Polymerization of Acrylic Acid onto PTFE Film by Remote Argon Plasma Initiation." *Applied Surface Science* 253(10): 4599–4606. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433206013055> (January 3, 2014).

Weibel, Daniel, Alexandre Michels, Flavio Horowitz, Silva Cavalheiro, and Gunar Mota. 2009. "Ultraviolet-Induced Surface Modification of Polyurethane Films in the Presence of Oxygen or Acrylic Acid Vapours." *Thin Solid Films* 517(18): 5489–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2009.03.204>.

Welscher, Yvonne M, Hendrik H ten Napel, Miriam Masià Balagué, Cleiton M Souza, Howard Riezman, Ben de Kruijff, and Eefjan Breukink. 2008. "Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol Without Permeabilizing the Membrane." *The Journal of biological chemistry* 283(10): 6393–6401. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165687> (December 30, 2013).

[www.airdplastico.wordpress.com](http://www.airdplastico.wordpress.com)- junio 2011

Xu SG, Sun YF, Du JM, Yang WT. Surface modification of LDPE by photografting acrylic acid. *J Beijing Univ Chem Technol* 2000;27:29–31

Yang WT, Ranby B. The role of far UV radiation in the photografting process. *Polym Bull* 1996;37:89–96)

Zhang, Wei, Paul K Chu, Junhui Ji, Yihe Zhang, Xuanyong Liu, Ricky K Y Fu, Peter C T Ha, and Qi Yan. 2006. "Plasma Surface Modification of Poly Vinyl Chloride for Improvement of Antibacterial Properties." *Biomaterials* 27(1): 44–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16005957> (July 17, 2014).

Zhu, Li-Ping, Bao-Ku Zhu, Li Xu, Yong-Xiang Feng, Fu Liu, and You-Yi Xu. 2007. "Corona-Induced Graft Polymerization for Surface Modification of Porous Polyethersulfone Membranes." *Applied Surface Science* 253(14): 6052–59. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433207000244> (July 29, 2014).

