

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales  
Doctorado en Ciencias de la Ingeniería

Tesis Doctoral



Estudio Teórico y Experimental del Proceso de  
Conservación de Productos Naturales Renovables

Autor: Ing. Matías Alejandro RASPO  
Directora: Dra. Alfonsina Ester ANDREATTA

Marzo de 2020



# Estudio Teórico y Experimental del Proceso de Conservación de Productos Naturales Renovables

*por*

Ing. Matías Alejandro RASPO

Dra. Alfonsina Ester ANDREATTA

*Facultad Regional San Francisco – Universidad Tecnológica Nacional*  
Directora de Tesis

## COMISIÓN ASESORA:

Dra. Raquel Evangelina MARTINI

*Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales – Universidad Nacional de Córdoba*

Dr. Martín CISMONTI DUARTE

*Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales – Universidad Nacional de Córdoba*

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba para cumplimentar los requerimientos de obtención del grado académico de Doctor en Ciencias de la Ingeniería.

Córdoba, Argentina  
Marzo de 2020





### ACTA DE EXAMEN

Libro: E2020 Acta: 00001 Hoja 01/01  
LLAMADO: Llamado del Turno (209)\_TESIS Doctorado Cs03/04/2020  
CATEDRA - MESA: 03-04-2020 Raspo

(P10-DI002) TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NÚMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGR.	COND.	NOTA	FIRMA
34469239	RASPO, Matías Alejandro	DNI 34469239	2015		A (Aprobado)	

PINTO, FEDERICO - ALVAREZ, CECILIA I. -

Observaciones:

Córdoba, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_-.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: \_\_\_\_\_

1	0	1	0	1
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados (0-3)	Aprobados (4-10)



***“Toda la sabiduría humana se resume  
en dos palabras: CONFIAR y ESPERAR”***

Alejandro Dumas  
*El Conde de Montecristo*





## AGRADECIMIENTOS

Cuando un día de la nada se me cruzó hacer un Doctorado, apostando a hacer lo que realmente me apasionaba, estuvo esa persona que se subió a mí locura y preparó un plan en menos de una semana para que pueda aplicar a una Beca CONICET. Sin ella, nada de esto hubiera sido posible. Decir que no tuvimos intercambios de palabras en cinco años sería faltar a la verdad, pero son incomparables con todas las veces que estuvimos codo a codo trabajando juntos. Alfonsina, o la jefa como le suelo decir, es el pilar fundamental de esta tesis. Simplemente ¡Gracias Alfon!

Por otro lado, cuando comenzamos a transitar este camino de manera formal, se sumó al equipo otro gran profesional: Cesar. Innumerables momentos compartidos por las mañanas en el Laboratorio de Ciencias Químicas, aprendiendo un mundo que me era parcialmente desconocido. Confieso que muchas veces no terminaba de entender lo que me decía, pero estoy seguro de que hicimos un gran equipo, y sinceramente espero que continuemos siéndolo.

Tampoco estos cinco años no hubieran sido lo mismo si cuando arranqué no hubiera conocido al hermoso grupo del IDTQ, hoy IPQA. La distancia no impidió sentirme parte, y cada vez que viajaba a Córdoba me encontraba un grupo humano excepcional, que aún con diferencias ideológicas, me hacían sentir como en casa, sin grietas. Nati, Flor, Mati: no tengo nada más que decir un gracias inmenso al infinito por habernos cruzado y haber compartido tanto las alegrías como las tristezas en estos años...

¡Qué decir de mi querida UTN Facultad Regional San Francisco! Mi segundo hogar. El lugar en donde fui aprendiendo y mejorando todo este tiempo. El que me abrió las puertas hace 13 años atrás y del cual nunca me fui. La educación pública no solo educa, también nos forma como personas y el permanecer dentro de ellas no es más que una devolución de todo lo que nos dio. Mis gracias sinceras para todos los becarios alumnos, encargados de laboratorios, secretarias de SECyT, compañeros de cátedras, y compañeros de oficina que fueron pasando a lo largo del tiempo, que me bancaron todos los días, cuando hablaba, cuando me enojaba, cuando ponía música, pero que estaban siempre mate en mano, para ir pasando el día a día. Especialmente quiero destacar a cuatro personas muy importantes para mí. Moni y Belén: ¡gracias por haberme tenido paciencia durante estos cinco años y haber compartido tantas

tardes! Lucho y Leo: gracias por haberme soportado especialmente estos últimos dos meses y darme un mensaje de aliento cuando más lo necesité, ¡son dos amigos de fierro!

A FAGDUT, el gremio docente de UTN, y en especial a Rodolfo Neira, por haberme ayudado durante estos cinco años a cumplir con este, el objetivo final.

A mis amigos, por el aguante de siempre aun cuando no terminan de comprender a qué me dedico.

Y por último a mi familia, no solamente por estar desde el momento cero cuando de un día para el otro les dije que dejaba un trabajo que era económicamente muy redituable para pasar a otro en el cuál no tenía previsión de futuro más allá de cinco años. Gracias por haber cuidado de Bakú en cada ausencia prolongada mía. Mami, Papi, Marcos y Martín: ¡Los amo!

## RESUMEN

La generación de envases biodegradables con el agregado de principios activos es una de las tecnologías que se encuentran en constante estudio en diferentes campos de investigación e industrias. El objetivo de esta tesis fue la generación de un nuevo tipo de recubrimiento biodegradable a base de quitosano, con la incorporación de ácido gálico como compuesto bioactivo puro, o de aceites esenciales derivados de cítricos, como mezclas de compuestos bioactivos. Las películas sintetizadas a partir de la evaporación de agua fueron caracterizadas mediante ensayos antioxidantes, antimicrobianos, mecánicos, fisicoquímicos y espectroscópicos. La optimización de la obtención de un recubrimiento con las características buscadas fue lograda a partir de la implementación de modelos de superficie de respuesta, y la optimización de las condiciones experimentales para la formación de las películas. Además, se realizaron pruebas incipientes a escala laboratorio sobre ensayos de biodegradabilidad y aplicabilidad para la conservación de tomates tipo cherry.

## ABSTRACT

The generation of biodegradable packaging with the addition of active principles is part of the technology that is constantly being created in different fields of research in the industry. The aim of this study was the generation of a new type of biodegradable material basing on chitosan, with the incorporation of gallic acid as a pure bioactive compound, or of essential oils derived from citrus fruits as mixtures of bioactive compounds. Antioxidants, antimicrobials, mechanics and physics assays were done. Response Surface Methodology was used to optimize different variables. In addition, incipient laboratory tests on biodegradability and applicability for the preservation of cherry tomatoes were performed.

## RESUMO

A geração de embalagens biodegradáveis com a adição de princípios ativos faz parte da tecnologia que está sendo constantemente criada em diferentes campos de pesquisa na indústria. O objetivo deste estudo foi a geração de um novo tipo de material biodegradável à base de quitosana, com a incorporação de ácido gálico como composto bioativo puro, ou de óleos essenciais derivados de frutas cítricas como misturas de compostos bioativos. Foram feitos ensaios de antioxidantes, antimicrobianos, mecânica e física. A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para otimizar diferentes variáveis. Além disso, foram realizados testes laboratoriais incipientes sobre biodegradabilidade e aplicabilidade para a preservação do tomate cereja.

## ABREVIATURAS

AA: ácido ascórbico

ABTS: capacidad antioxidante mediante ABTS

ACP: análisis de componentes principales

AM: película ambiente

ANOVA: análisis de la varianza

AR: Argentina

B: blanco

CE: Comisión Europea

CEO: aceites esenciales cítricos

CM: comercial

CUPRAC: capacidad antioxidante reductora del cobre

DPPH: capacidad antioxidante mediante DPPH

E: módulo de Young

EB: elongación a la rotura

EO: aceites esenciales

Fig.: figura

FRAP: poder antioxidante de reducción férrica

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

G': módulo de almacenamiento

G'': módulo de pérdidas

GA: ácido gálico

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

GD: grado de desacetilación

H: lugar húmedo

I: Inhibición

O: opacidad

OP: película óptima

P: permeabilidad

QS: quitosano

ROS: especies reactivas al oxígeno

RSM: metodología de superficie de respuesta

S: lugar seco

SA: ácido salicílico

SB: sorbitol

SD: desviación estándar positiva

SEM: microscopía de barrido electrónico

T: temperatura

t: tiempo

T80: Tween 80

TEAC: capacidad antioxidante equivalente a Trolox

TPC: contenido total de polifenoles

TS: resistencia a la tracción

US: Estados Unidos

UV-Vis: UV-Visible

WVT: tasa de transmisión de vapor de agua

## CONTENIDO

RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	11
RESUMO .....	12
ABREVIATURAS.....	13
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	19
PLANTEO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
ENVASES ACTIVOS .....	23
COMPUESTOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO .....	24
QUITOSANO.....	24
ÁCIDO GÁLICO .....	29
SORBITOL.....	30
ACEITES ESENCIALES.....	32
ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS.....	33
OTROS COMPUESTOS UTILIZADOS.....	35
TWEEN 80 .....	35
ÁCIDO SALICÍLICO .....	35
PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO .....	36
CONCLUSIONES .....	40
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOLOGÍAS .....	41
MATERIALES .....	41
GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSANO .....	41
PREPARACIÓN DE PELÍCULAS .....	42
CARACTERIZACIÓN DE MEZCLAS DE REACCIÓN Y PELÍCULAS .....	42
ANÁLISIS REOLÓGICO .....	42
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS .....	43
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR) .....	43
ENSAYOS ANTIOXIDANTES .....	43
ENSAYOS MECÁNICOS .....	46
OPACIDAD.....	47
TASA DE TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA (WVT) .....	48
MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM) .....	49
ANÁLISIS DEL COLOR .....	49
ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD .....	50
METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	50

DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	51
DISEÑO DOEHLERT .....	52
OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	53
CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	53
CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA CON ESPETROMETRÍA DE MASAS.....	53
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE .....	54
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	57
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS .....	59
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	59
CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO, ÁCIDO GÁLICO Y SORBITOL.....	61
ANÁLISIS EXPLORATORIO .....	61
CARACTERIZACIONES DE MEZCLAS Y PELÍCULAS .....	62
DISEÑO DE EXPERIMENTO Y METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	69
SUPERFICIES DE RESPUESTA.....	70
OPTIMIZACIÓN .....	79
CONCLUSIONES .....	80
CAPÍTULO 4: EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE REACCIÓN SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO .....	83
MATERIALES Y METODOS.....	83
PREPARACIÓN DE PELÍCULAS .....	83
ANÁLISIS EXPLORATORIO .....	85
DISEÑO DE EXPERIMENTO Y METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	92
SUPERFICIES DE RESPUESTA.....	93
OPTIMIZACIÓN .....	100
VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE MODIFICACIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN.....	101
BIODEGRADABILIDAD DE PELÍCULAS DE QUITOSANO .....	102
CONCLUSIONES .....	105
CAPÍTULO 5. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS Y SU USO EN LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO ACTIVAS.....	107
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	107
PERFIL QUÍMICO Y SENSORIAL .....	107
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE .....	110
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	114
ANÁLISIS MULTIVARIADO.....	119
INHIBICIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	120
CONCLUSIONES .....	122
CAPÍTULO 6: OTRAS PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO .....	125



ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MSR .....	125
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	129
INTERACCIÓN QUITOSANO-COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	131
CONCLUSIONES .....	133
CAPÍTULO 7: ESTUDIO DE APLICACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO .....	135
CONSERVACIÓN DE TOMATES CHERRY.....	135
CONCLUSIONES .....	139
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES DE TRABAJO.....	141
BIBLIOGRAFÍA .....	143



## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### PLANTEO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El reino vegetal es, en efecto, una inagotable fuente de recursos naturales renovables. Las plantas pueden ser consideradas como un eficiente “laboratorio químico” en el que, partiendo de dióxido de carbono y agua como reactivos, se produce por fotosíntesis una enorme variedad de sustancias que concentran la energía solar bajo la forma de enlaces químicos. Las plantas en su conjunto producen más de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides, ácidos grasos, etc. (Li, Kong, Fu, Sussman, & Wu, 2020).

La utilización a gran escala de materia prima de origen vegetal en general se ve obstaculizada por su condición de ser un producto estacional no constante, y por el hecho de tratarse de una materia prima disponible en concentraciones pequeñas en un dado territorio o área. Esto hace muchas veces económicamente no competitivos a emprendimientos que son técnicamente factibles. Sin embargo, la actividad puede resultar atractiva a nivel de la pequeña y mediana empresa, ya que su procesado introduce valor agregado a la producción primaria, y brinda una vía alternativa a esa materia prima en caso de caídas bruscas en los precios de comercialización del producto primario (Calvo Martínez, 2014).

El desarrollo de estos emprendimientos muchas veces está condicionado por diversos factores como lo son los fenómenos climáticos (cambios climáticos, sequías e inundaciones) que en general son temporarios, ocasionales, ingobernables e imprevisibles; factores políticos (restricciones aduaneras, impuestos internos, subvenciones a la producción, promociones especiales); factores económicos y de mercado (sobreproducción internacional, aparición de nuevas materias competitivas, modas, restricciones de uso, merma de la demanda, competencia con productos sintéticos, aumento de precios o demanda en cultivos tradicionales); factores laborales y de competitividad entre los procesos de extracción del producto natural y el camino alternativo de síntesis química.

En el caso particular de la Provincia de Córdoba, como otras regiones del país, la diversidad de relieves y climas favorece el desarrollo de una gran variedad de productos naturales, las cuales constituyen una fuente interesante de materia prima para su explotación.

Un buen aprovechamiento de los recursos naturales, que genere valor agregado a partir de desarrollos tecnológicos, requiere encontrar respuestas factibles, económicas y sustentables a problemas de extracción, separación, purificación, conservación, etc.

Por su parte, los distintos métodos de conservación de productos naturales pretenden incrementar su vida útil durante el almacenamiento, a partir de la aplicación de técnicas que logren impedir alteraciones microbiológicas del producto y que mantengan su calidad.

La eficacia de los métodos empleados para tal fin depende principalmente del cuidado de la higiene durante su producción, siendo su objetivo disminuir la carga microbiana y evitar su desarrollo (González-Torralba & Alós, 2015; Moreno & Alarcón, 2010; Revenga Frauca, 2011).

Para tal fin, muchos productos naturales son tratados térmicamente, técnica que muchas veces modifica las características tanto sensoriales (textura, sabor y color) como nutricionales (pérdidas de vitaminas, principalmente) del mismo. Debido a estos efectos adversos del tratamiento a altas temperaturas, se encuentran en desarrollo procesos no térmicos de conservación, como el uso de radiación ultravioleta, liofilización, deshidratación osmótica, etc., con menor agresividad que los tratamientos térmicos y tienen la ventaja de ofrecer productos semejantes a los frescos. Por ejemplo, está en auge la utilización de radiofrecuencia para inactivar los microorganismos que pueden estar presentes en frutas y verduras, utilizando temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (Trujillo & Geveke, 2014).

Además, como otra alternativa de conservación de productos naturales se incluye el desarrollo de películas de recubrimiento que aíslan a los primeros de microorganismos como de otros agentes externos contaminantes. En ese sentido, estos materiales envoltorios protegen y alargan la vida útil del producto mediante el control de la difusión de gases con su entorno. Una de las grandes ventajas de este tipo de recubrimientos es la posibilidad de incorporación de componentes bioactivos en la estructura soporte de este. En la actualidad, existe un creciente interés en la utilización de agentes antioxidantes provenientes de fuentes naturales debido a la amplia potencialidad de sus aplicaciones. Los agentes antioxidantes naturales tienen la particularidad de proteger a las células constitutivas del producto natural del estrés oxidativo a través de varias vías. Dado que el estrés oxidativo es responsable de una gran variedad de enfermedades degenerativas, estos compuestos antioxidantes pueden contribuir de manera significativa al bienestar humano, por lo que la determinación de las propiedades antioxidantes de un compuesto es una de las áreas de investigación que ha tomado alta relevancia en los últimos tiempos (Kehrer & Smith, 1994).

La generación de radicales libres es un proceso inevitable y continuo, y es parte de nuestro metabolismo normal. Sin embargo, una sobreproducción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a factores internos y/o externos, puede crear un desequilibrio que resulta en estrés oxidativo (Gupta & Lakes, 2016). Este daño oxidativo se acumula con la edad y conduce al envejecimiento, enfermedades degenerativas, disfunción cerebral, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y hasta cáncer (Chatterjee, 2016). En este sentido, en la actualidad existen un número importante de drogas sintéticas que ofrecen protección contra los efectos nocivos del estrés oxidativo; sin embargo, la mayoría de estas sustancias están asociadas a efectos secundarios adversos no deseados (Adachi *et al.*, 2007). Por ese motivo, durante los últimos años las tareas de investigación y desarrollo se han centrado en identificar compuestos antioxidantes que sean clínicamente potentes con efectos secundarios bajos o nulos, para ser utilizados en terapias preventivas. Existe un amplio número de referencias científicas que respaldan la afirmación de que una mayor ingesta de frutas frescas, vegetales o plantas ricas en antioxidantes naturales se asocia con menores incidencias de enfermedades inducidas por radicales libres como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer (Miller *et al.*, 2015; Valmórbida & Vitolo, 2014). Por lo tanto, en la actualidad se está prestando especial atención a los agentes antioxidantes de origen natural, cuyas propiedades se atribuyen a la presencia de flavonoides, antocianinas y compuestos fenólicos. Un gran número de estos últimos poseen la capacidad de eliminar especies reactivas como los radicales superóxidos, hidroxilos y peróxidos lipídicos y de inhibir la peroxidación lipídica (Celep, Akyüz, İnan, & Yesilada, 2018; Mulero *et al.*, 2015). Estos compuestos fenólicos emergen como agentes antirradicales fuertes en gran parte debido a sus propiedades redox, que los hacen donantes eficientes de hidrógeno, agentes reductores y quelantes de metales (Michalak, 2006).

El creciente interés por el cuidado del medio ambiente hace que actualmente las industrias alimenticias, entre otros tipos de industrias, se encuentren frente al desafío de reemplazar sus tradicionales envases por otros que sean de origen natural como los biopolímeros, biocompuestos, etc. Por otra parte, en la actualidad existe en general una mayor exigencia por parte de la sociedad respecto de las propiedades del producto de consumo. La generación de envases biodegradables con el agregado de principios activos es una de las tecnologías que se encuentran en constante estudio en diferentes campos de investigación e industrias.

Dentro de todo el universo de alternativas posibles, la utilización de biopolímeros como precursores de envases y/o películas, es la quien lleva la ventaja, debido a que éstos son naturales y biodegradables. Quitosano es un polisacárido lineal, derivado de quitina presente en el caparazón de insectos y crustáceos, y está compuesto de cadenas de  $\beta$ -1,4-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina aleatoriamente distribuidas (Xie, Hu, Wang, & Zeng, 2014). Es insoluble en agua y soluble en ácidos orgánicos tales como acético o láctico (Pillai, Paul, & Sharma, 2009; Rinaudo, 2006).

El ácido gálico o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico es un metabolito secundario presente en diversas especies vegetales tales como arándanos, manzanas, lino y en las hojas de té. Se lo conoce por su natural actividad antioxidativa, además de su actividad antimicrobiana (Aruoma, Murcia, Butler, & Halliwell, 1993; Chanwitheesuk, Teerawutgulrag, Kilburn, & Rakariyatham, 2007).

Teniendo en cuenta que quitosano tiene capacidad de formar películas a partir de puente hidrógeno, y teniendo en cuenta que la estructura molecular de ácido gálico tiene capacidad de formar puente hidrógeno u otro tipo de interacción secundaria, se propone desarrollar películas con actividad antioxidante y antibacteriano a partir de la formación de una malla entrecruzada mediante interacciones cooperativas de estas sustancias con las cadenas de quitosano utilizando el proceso de "casting". Además, se postula el uso de Metodología de Superficie de Respuesta con el objeto de ajustar las variables de síntesis evaluadas en la formación de las películas de quitosano.

Para ello, esta tesis presenta como **objetivo general** la selección de componentes bioactivos extraídos de productos naturales renovables con actividad antimicrobiana, y/o actividad antioxidante para su utilización en la formulación de películas de recubrimiento. Para el desarrollo del objetivo general se propone completar los siguientes **objetivos específicos**:

- Generar películas biodegradables a partir de la combinación de quitosano y algún compuesto activo.
- Analizar el efecto de agentes plastificantes sobre las propiedades fisicoquímicas de las películas obtenidas.
- Estudiar las consecuencias en la modificación de las condiciones de reacción para la preparación de películas.
- Utilizar la Metodología de Superficie de Respuesta para generar modelos predictivos según el comportamiento que se espere de las mismas.

- Evaluar la incorporación de aceites esenciales en formulaciones para la obtención de películas de quitosano modificadas.
- Considerar aplicaciones de películas basadas en quitosano.

A continuación, se detalla de manera resumida la compilación de mi Tesis Doctoral con el objeto de facilitar su lectura y comprensión:

- = En el capítulo 1 se presentará un estudio del arte acerca de los compuestos involucrados a lo largo de todo el proyecto.
- = En el capítulo 2 se darán a conocer en líneas generales todos los materiales y ensayos que fueron utilizados a lo largo de la tesis.
- = Los capítulos 3 y 4 se centran específicamente en el desarrollo particular de una película a base de quitosano y ácido gálico, y la generación de modelos de superficie de respuestas para la obtención de variables optimizadas.
- = El capítulo 5 plantea un análisis exhaustivo de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de aceites esenciales obtenidos de cítricos de dos orígenes diferentes, además de su potencial aplicación en películas a base de quitosano.
- = En el capítulo 6 se analiza los cambios producidos sobre las películas cuando el compuesto bioactivo y el plastificante son modificados.
- = Por último, el capítulo 7 versa sobre las potencialidades que presentan estas películas para la conservación de tomates tipo cherry.

## ENVASES ACTIVOS

Tradicionalmente, los envases de alimentos se limitaron a proteger a los mismos de cualquier deterioro que pudieran sufrir por alguna acción externa, al actuar como una barrera física entre el producto alimenticio y el entorno. Sin embargo, en los últimos años, ha aumentado considerablemente el número de consumidores que demandan la ingesta de alimentos de alta calidad, sin aditivos, sin procesamiento o mínimamente procesados y que sean seguros. Como respuesta a esta necesidad, se ha empezado a trabajar en la modificación de la mera función protectora de un envase, desarrollando nuevas tecnologías innovadoras, como el envasado activo. El envase activo se define en el reglamento europeo (CE) N° 450/2009 como un sistema de envasado que interactúa con los alimentos "incorporando deliberadamente compuestos que liberarían o absorberían sustancias en el alimento envasado o en el entorno que lo rodea",

proveyéndolos de funciones adicionales, pero de vital importancia, que van más allá de la simple función de barrera.

Existen dos tipos de envases activos: aquellos que actúan como barrera o como removedores de sustancias indeseables tales como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>, los cuales son denominados envases activos absorbentes, y por otro lado, aquellos envases que cuentan en su composición química con compuestos bioactivos, los cuales dotarán al material de diferentes propiedades tales como actividad antioxidante o antimicrobiana, que son denominados envases activos emisores (Day & Potter, 2011; Devlieghere, Vermeiren, & Debevere, 2004).

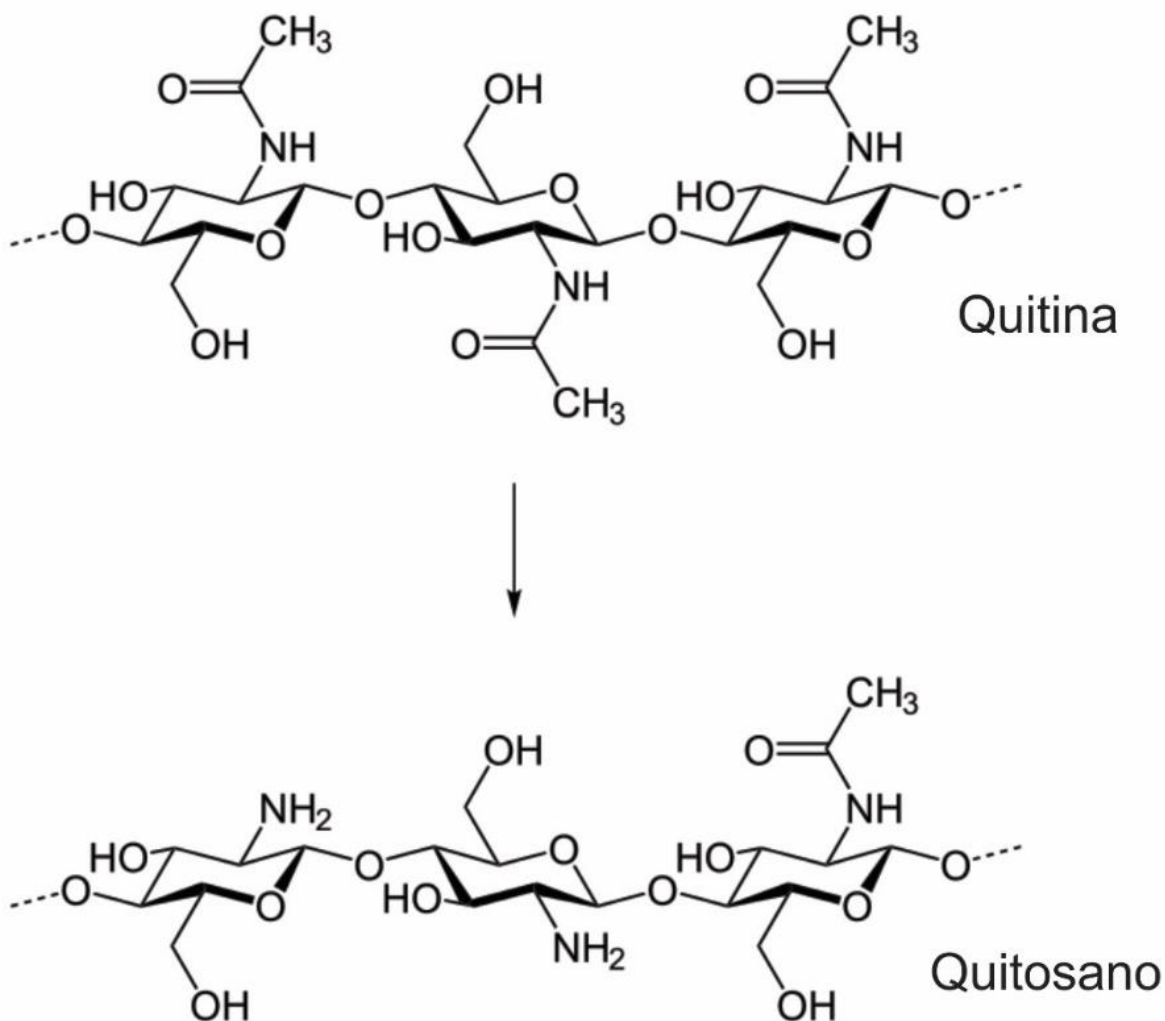
## COMPUESTOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

### QUITOSANO

En la actualidad, se presta especial atención a quitosano debido a su gran cantidad de cualidades atribuidas que dependen de manera directa de sus propiedades fisicoquímicas. Este compuesto se obtiene a partir de la modificación de quitina, que es el segundo biopolímero más abundante en el mundo. Se estima que al menos 10 giga toneladas de quitina se bio-sintetizan y degradan cada año en la biosfera (Elsabee & Abdou, 2013).

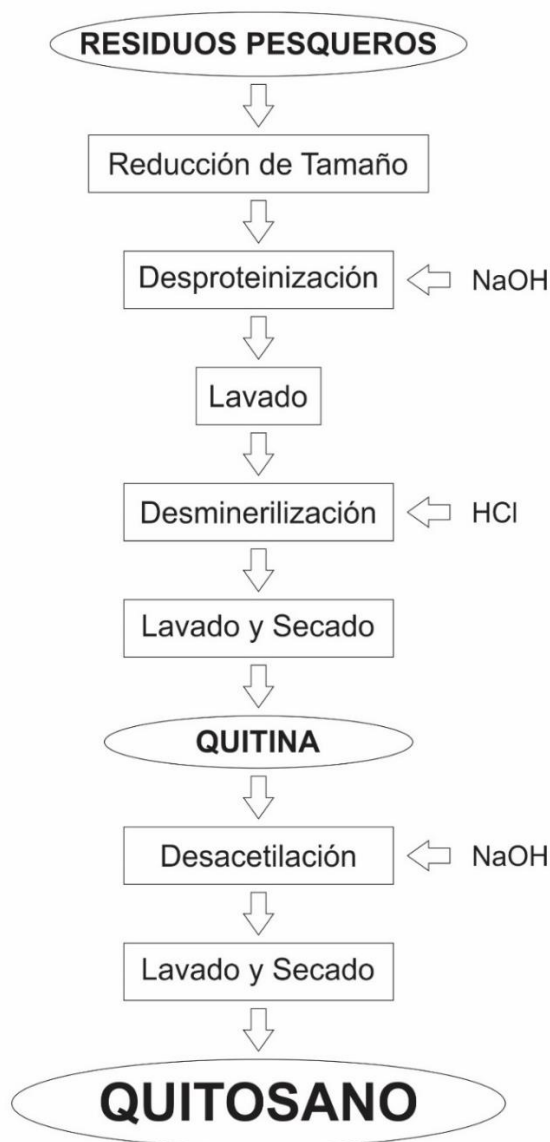
Por su parte, el compuesto quitosano es una especie parcialmente desacetilada de quitina, un polisacárido lineal que contiene unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidas aleatoriamente (Fig. 1.01), donde este polisacárido se denomina quitosano si el grado de desacetilación es superior al 60%.





**Fig. 1.01.** Estructura polimérica de quitina y quitosano.

Este último compuesto tiene la propiedad de disolverse en la mayoría de las soluciones de ácidos orgánicos como ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico, y también en ácidos minerales diluidos, a excepción de ácido sulfúrico (Pillai *et al.*, 2009). Este polisacárido se procesa industrialmente a partir de las estructuras protectoras (caparazón) de crustáceos como cangrejos, camarones y langostinos. Existen varias metodologías para la eliminación del grupo acetilo de quitina, pero la más ampliamente difundida es aquella que se realiza mediante hidrólisis alcalina de quitina con NaOH concentrado a altas temperaturas, siguiendo el esquema que muestra la Figura 1.02 (Bonfante-Alvarez, De Avila-Montiel, Herrera-Barros, Torrenegra-Alarcón, & González-Delgado, 2018).



**Fig. 1.02.** Obtención industrial de quitosano mediante hidrólisis alcalina.

El polímero quitosano presenta diferentes propiedades biológicas beneficiosas, las que lo hacen que sea aplicable en varios campos diversos, como cosméticos, agricultura, industria alimentaria, productos farmacéuticos, biotecnología y medicina (Bakshi, Selvakumar, Kadirvelu, & Kumar, 2019; Frank *et al.*, 2020; Negm, Hefni, Abd-Elaal, Badr, & Abou Kana, 2020). Este biopolímero ha sido considerado como un agente antimicrobiano y de control de plagas en aplicaciones agrícolas, pudiendo utilizarse en distintas formas para prevenir el desarrollo y la propagación de enfermedades en plantas (Badawy & Rabea, 2016; Sathiyabama & Manikandan, 2016; Vanti, Masaphy, Kurjogi, Chakrasali, & Nargund, 2019). La actividad antimicrobiana depende de varios factores como su grado de desacetilación, peso molecular, pH, etc. (Ma, Garrido-Maestu, & Jeong, 2017). Ziani *et al.* (2010) establecieron que la

combinación de quitosano con el fungicida químico Tetramethylthiuram disulfide (TMTD) en concentraciones reducidas resultaron en una fuerte protección antifúngica, en buena germinación y plántulas mejoradas, sobre la aplicación directa sobre semillas de alcachofa. Zeng y Luo (2012) encontraron que semillas de trigo recubiertas con quitosano mejoraron significativamente la tasa de germinación, los parámetros de crecimiento de las plántulas y algunos índices fisiológicos propios de las plantas. Paula *et al.* (2006) encapsularon con éxito un larvicida en una mezcla de quitosano y goma arábiga, y se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* sobre la cinética de liberación para el control de la larva de *Aedes aegypti*.

El polisacárido quitosano se considera un agente antioxidante secundario ya que tiene la capacidad de quelar los iones metálicos involucrados en la catálisis de una reacción oxidativa (Taylor, Tharanathan, & Kittur, 2003). Diferentes grados de N-desacetilación brindan a este polímero, obtenido de las cáscaras de cangrejo, actividad antioxidante, capacidad de eliminación de radicales hidroxilo y capacidad quelante de iones ferrosos, siendo más eficaz como agente antioxidante a medida que aumenta su grado de desacetilación (Yen, Yang, & Mau, 2008).

Una propiedad muy conocida de quitosano es que forma un recubrimiento semi permeable, y mejora la vida en anaquel de alimentos, entre otras cosas, por las pérdidas transpiracionales (El Ghaouth, Arul, Ponnampalam, & Boulet, 1991; Ghaouth, Ponnampalam, & Castaigne, 1992). El polímero de quitosano ofrece muchas ventajas cuando se usa como recubrimiento en productos alimenticios, ya que tiene propiedades únicas como la no toxicidad, la biodegradabilidad y las actividades antimicrobianas y antioxidantes (Al-Holy, Al-Nabulsi, Osaili, Ayyash, & Shaker, 2012).

Yadav y colaboradores han desarrollado con éxito películas activas biodegradables a base de quitosano que incorporan gelatina y quercetina con propiedades antibacterianas y antioxidantes que puedan tener buenas propiedades fisicoquímicas (Yadav, Mehrotra, Bhartiya, Singh, & Dutta, 2020).

Además de usar quitosano como único componente, se ha realizado un gran número de estudios sobre la composición de diferentes tipos de extractos naturales para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las películas poliméricas a base de quitosano. Souza *et al.* (2017) desarrollaron con éxito películas activas biodegradables utilizando una variedad de antioxidantes naturales, en donde el espesor del biomaterial no sufrió modificaciones y las propiedades funcionales evaluadas no demostraron fuertes diferencias debido a la

incorporación de compuestos activos. Las películas también presentaron una mayor solubilidad en agua y grado de hidratación, y un menor índice de hinchamiento en comparación con películas de quitosano puro, debido a la interacción del agua, quitosano y los polifenoles presentes en los extractos utilizados. Esto representa una ventaja para el proceso de biodegradación, pero también puede limitar su aplicación a alimentos con alto contenido de agua. En este contexto, los tratamientos de reticulación que mejoran la resistencia de la película al agua pueden representar una solución alternativa. Sin embargo, el potencial real de estos materiales para su aplicación en la industria del envasado de alimentos debe coincidir con la migración potencial de los agentes antioxidantes desde la película hacia los alimentos.

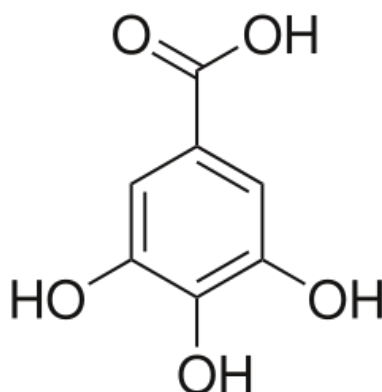
La incorporación de compuestos antimicrobianos tales como péptidos, metales o aceites esenciales en la matriz polimérica también puede mejorar la acción antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano. Se sabe que la combinación de aceite de clavo de olor y quitosano exhibió en pruebas *in vitro* una mayor propiedad antifúngica sobre *Penicillium digitatum* que los tratamientos individuales de manera separada de quitosano y clavo de olor (Shao *et al.*, 2015). Aloui *et al.* (2014) estudiaron la combinación de quitosano con aceites esenciales de cítricos, y además de la ausencia total de sabores y olores desagradables, demostraron el potencial de la aplicación como una alternativa efectiva y prometedora a los agentes antifúngicos sintéticos para controlar el crecimiento post cosecha de *Aspergillus flavus*.

En la actualidad, las formulaciones farmacéuticas para aplicaciones médicas y estéticas de quitosano también se encuentran en auge. Liu *et al.* (2018) han desarrollado un hidrogel funcional a base de quitosano como vendaje para heridas y sistema de administración de fármacos en el tratamiento de la cicatrización de heridas. El hidrogel a base de quitosano se considera un material ideal debido a sus características de ser biodegradable, biocompatibles y antimicrobianos. También se conoce que se han desarrollado apósitos de quitosano para heridas, los cuales pueden administrar agentes antibacterianos, factores de crecimiento, células madre, péptidos y otras sustancias activas de forma sostenida (Straccia, D'Ayala, Romano, Oliva, & Laurienzo, 2015). Además, este polisacárido se lo considera como un suplemento dietético para reducir el peso corporal en humanos, y se ha producido tabletas de quitosano a nivel industrial (Muzzarelli *et al.*, 2000) y fibras dietéticas de quitosano (Hughes, 2002). Además, Schiller *et al.* (2001) desarrollaron un quitosano modificado a partir

de la adición de ácido succínico durante el proceso de fabricación, que exhibe una mayor densidad aparente (sin sacrificar el peso molecular del polímero) y una rápida solubilidad en ácido en comparación con otros quitosanos. Los estudios *in vitro* han demostrado que este quitosano modificado se disuelve más rápido en ácido clorhídrico 0,16 N en comparación con los quitosanos típicos por lo que puede ingerirse justo antes de una comida y reducir los triglicéridos séricos durante un período de tiempo posterior a la comida, siendo un suplemento eficaz para perder o mantener el peso corporal.

### ÁCIDO GÁLICO

El reactivo ácido gálico (ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico) es un compuesto polifenólico natural que se encuentra en bebidas procesadas como los vinos tintos y los tés verdes. Su formación tiene lugar en plantas en forma de ácidos libres, ésteres, derivados de catequina y taninos hidrolizables (Pengelly, 2004). El interés en estos compuestos se debe a su actividad farmacológica como captadores de radicales. Se ha demostrado que tiene posibles efectos preventivos y terapéuticos en muchas enfermedades, donde el estrés oxidativo ha sido implicado, incluidas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y el envejecimiento (Y. Liu, Carver, Calabrese, & Pukala, 2014; Schimites *et al.*, 2020; Stanely Mainzen Prince, Priscilla, & Devika, 2009).



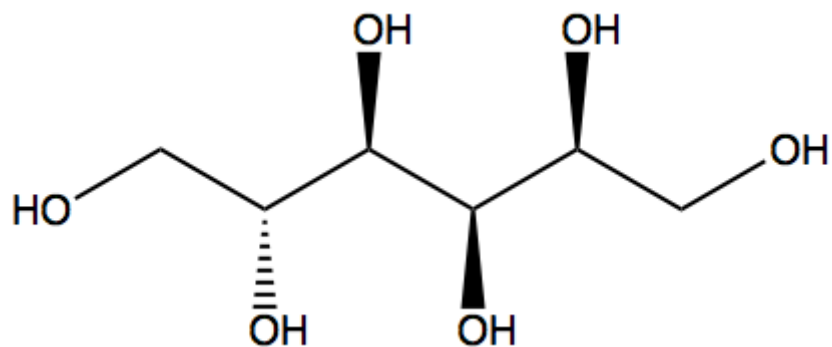
**Fig. 1.03.** Estructura de ácido gálico.

Se encuentra en varias plantas terrestres como la planta parásita *Cynomorium coccineum*, la planta acuática *Myriophyllum spicatum* y el alga azul-verde *Microcystis aeruginosa* (Marko,

Gross, Newman, & Gleason, 2008; Meng, Wang, Li, Kuang, & Ma, 2013). También se encuentra en varias especies de robles, en la fruta de diferentes especies de algarrobos y en la corteza del tallo de *Boswellia dalzielii*, entre otras. Muchos productos alimenticios contienen cantidades variadas de ácido gálico, especialmente frutas (frutillas, uvas, bananas), así como té y clavo de olor. El interés en estos compuestos se debe a su actividad farmacológica como captadores de radicales. Para citar algunos ejemplos, Punithavathi *et al.* (2011) informaron los efectos antihiperoglucémicos, peroxidativos y antioxidantes antilípidos de ácido gálico en ratas macho diabéticas inducidas por estreptozotocina. Lu *et al.* (2006) investigaron la relación entre las estructuras de los derivados de ácido gálico, sus actividades antioxidantes y los efectos neuroprotectores, examinando los efectos de eliminación de radicales libres en liposomas y actividades anti apoptóticas en humanos. Bajpai *et al.* (2005) informaron que el contenido fenólico de las plantas medicinales es el responsable de la actividad antioxidante, y que la fruta *T. bellerica* contiene una rica fuente de ácido gálico. Por otro lado, los efectos antiinflamatorios y antialodínicos de los polvos secados por aspersión a partir de hojas, tallos, raíces, la mezcla de hojas y tallos, así como las soluciones acuosas de *Phyllanthus niruri* L., ricas en ácido gálico, fueron informados por Couto *et al.* (2013). Yang *et al.* (2016) estudiaron los efectos de ácido gálico sobre la cicatrización de heridas en condiciones normales e hiperoglucémicas, para imitar la condición de una persona con diabetes, en queratinocitos y fibroblastos humanos. Por último, y para detallar solamente algunas aplicaciones, Ho *et al.* (2010) han investigado el efecto de los ácidos fenólicos que se encuentran abundantemente en las verduras, es decir, ácido gálico, ácido cafeico y ácido protocatecuico, en la inhibición de la metástasis de células de adenocarcinoma gástrico.

## SORBITOL

El compuesto sorbitol es un carbohidrato de baja digestibilidad que ha existido comercialmente durante más de 70 años. Se clasifica como "alcohol de azúcar" o "poliol" y a menudo se usa como agente de carga, humectante, agente de reticulación, crioprotector y modificador de la cristalización sin azúcar en diferentes industrias (M. Liu, Zhou, Zhang, Yu, & Cao, 2013).



**Fig. 1.04.** Estructura de sorbitol.

Los jarabes de glucosa, el azúcar invertido y otros almidones hidrolizados son materias primas importantes para la fabricación de sorbitol, que se produce a partir de la hidrogenación catalítica de glucosa donde la reacción de hidrogenación es catalizada con níquel. La solución de sorbitol atrae y libera humedad en condiciones de humedad variables, pero lo hace muy lentamente (Peng, Chan, & Chow, 2001). A diferencia de glicerina, un poliol de bajo peso molecular que tienden a ganar y perder agua más rápidamente, sorbitol proporciona un mejor control de la humedad en equilibrio con el entorno (Ooi, Ismail, Bakar, & Aziz, 2012), a partir de una tasa más lenta de cambio en el contenido de humedad del sistema de envasado en el que pueda ser utilizado, manteniendo la calidad de productos alimenticios, y extendiendo su vida útil. El uso de sorbitol se da en alimentos, confitería, cuidado bucal e industria farmacéutica debido a sus propiedades físicas y químicas únicas (Marques, Tarek, Sara, & Brar, 2016). Este compuesto posee funciones que son beneficiosas dentro del producto final, exhibiendo estabilidad e inercia química cuando está en contacto con muchas combinaciones químicas de ingredientes. La solución de sorbitol puede ser utilizada tal como se produce, o modificada con algún otro componente soluble en ella, de manera tal de mejorar alguna de sus propiedades físico-química, o simplemente, mejorar su flavor (Dai *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2017; Zarei, Abdolrahimi, & Pazuki, 2019). Por otro lado, los grupos hidroxilos de sorbitol lo convierten en un plastificante efectivo para algunos polímeros ricos en grupos hidroxilos y aminos (Laohakunjit & Noomhorm, 2004). Mohsin *et al.* (2011) demostraron que sorbitol forma interacciones secundarias del tipo puente de hidrógeno con algunos polímeros, y que desempeñó un papel importante como plastificante al reducir las interacciones entre las macromoléculas, provocando una disminución de la dureza y del módulo elástico. Además,

sorbitol no es tóxico y se permite usarlo en contacto con alimentos siendo una buena opción para fabricar materiales de envasado de alimentos (Williams-Ashman, 1965).

## ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales están presentes en varias plantas aromáticas y son obtenidos de varias partes de las mismas, incluyendo hojas, flores, frutas, semillas, brotes, rizomas, raíces y cortezas (Pengelly, 2004). Se han utilizado varios métodos de extracción para obtener aceites esenciales de la planta entre ellas la hidrodestilación, la extracción con solvente, el prensado en frío y la extracción con fluido supercrítico (Bellik *et al.*, 2019; Giacometti *et al.*, 2018). Sin embargo, la técnica más ampliamente utilizada desde la antigüedad es la destilación con arrastre de vapor. El producto de extracción puede variar en calidad, cantidad y composición según el clima, la composición del suelo, el órgano de la planta, la edad y la etapa del ciclo vegetativo. Por lo tanto, para obtener aceites esenciales de composición constante, deben extraerse en las mismas condiciones del mismo órgano de la planta que ha estado creciendo en el mismo suelo, bajo el mismo clima y ha sido recolectado en la misma estación (Melito *et al.*, 2016; Vaičiulytė, Ložienė, Taraškevičius, & Butkienė, 2017). Estos extractos son mezclas naturales muy complejas que pueden contener entre 20 y 60 componentes, y de concentraciones variadas donde dos o tres componentes principales poseen concentraciones relativamente altas (20-70%) frente a trazas del resto. Se han empleado en gran medida por sus propiedades ya observadas en la naturaleza, es decir, por sus actividades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, 300 de los cuales son comercialmente importantes, especialmente para las industrias farmacéutica, agronómica, alimentaria, sanitaria, cosmética y de perfumes (Başer & Buchbauer, 2010). Además, los aceites esenciales se usan en masajes como mezclas con aceite vegetal o en baños, pero con mayor frecuencia en aromaterapia. Algunos aceites esenciales parecen exhibir propiedades medicinales particulares, tales como actuar como antiviral ante influenza (Tseliou, Pirintsos, Lionis, Castanas, & Sourvinos, 2019), o mitigar los defectos cognitivos que provoca el Mal de Alzheimer (Sadiki *et al.*, 2019).



## ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS

Con una producción promedio de 10 millones de toneladas y 3 mil millones de dólares entre 2007 y 2017, las especies de cítricos tienen una importante contribución en el mercado mundial de frutas y verduras (USDA Foreign Agricultural Service, 2018). Argentina y Estados Unidos tienen vastas plantaciones de cítricos en sus territorios debido a la fertilidad de sus suelos y clima apropiado. Su producción se correlaciona con altos niveles de consumo de cítricos y sus productos derivados, los cuales tienen una gran importancia económica para la industria alimentaria. Además, la agroindustria de los cítricos proporciona importantes productos como lo es el procesamiento posterior de las propias frutas, lo cual produce importantes productos alimenticios como los jugos y concentrados que provienen de la pulpa de la fruta (endocarpio). Las cáscaras, y específicamente el flavedo, son fuentes importantes de productos industriales tales como aceites esenciales y otros metabolitos secundarios valiosos (Iglesias *et al.*, 2007). Los aceites esenciales (EO) se consideran cultivos industriales valiosos, ya que tienen muchos usos no alimentarios, incluidos cosméticos, fragancias y preparaciones farmacéuticas (Finch, Samuel, & Lane, 2014). Dado que los cítricos han generado desde la antigüedad productos alimenticios y sus partes desechadas, como las cáscaras, se descartaron tradicionalmente, la identificación de nuevos usos y aplicaciones de estos desechos es una estrategia importante para encontrar aplicaciones para productos industriales.

Hoy en día, es común encontrar consumidores que prefieren los aditivos naturales en lugar de los fabricados sintéticamente. Entre los aditivos naturales, podemos encontrar algunos aceites esenciales, que durante mucho tiempo han sido reconocidos por su actividad biológica, la cual incluye la actividad antimicrobiana y la actividad antioxidante. Además, los productos derivados de cítricos, como los mismos aceites esenciales, presentan una oportunidad de mercado ya que su producción es relativamente sencilla.

Investigaciones similares se han realizado sobre aceites esenciales de cítricos. Sin embargo, éstos estudios solamente se centraron en la actividad antimicrobiana y los autores no incluyen ninguna información sobre la composición de los aceites esenciales, o no hay estudios comparativos para las especies de cítricos de diferentes orígenes (Jing *et al.*, 2014; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2008).

Los aceites esenciales de cítricos (CEO) tienen una fracción volátil generalmente superior al 90% P/P y una fracción no volátil. En estas especies, los monoterpenos y los sesquiterpenos representan principalmente la fracción volátil, siendo limoneno el compuesto mayoritario. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (USDA) consideran a limoneno como un material “GRAS: Generally Recognized as Safe”, lo que significa que es un aditivo seguro.

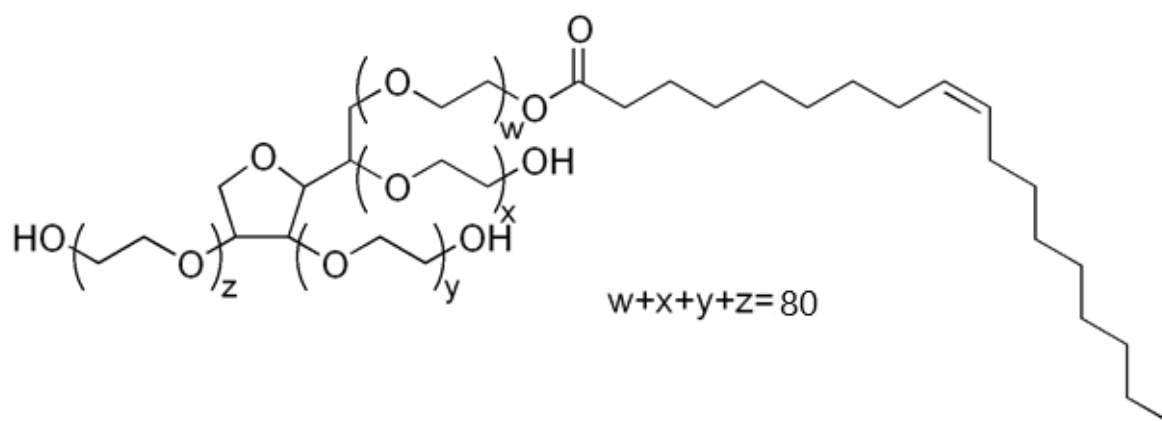
Muchos autores han estudiado sus aplicaciones y efectos, por ejemplo, Aissou *et al.* (2017) han utilizado limoneno como producto químico primario a partir de desechos agroindustriales, obteniendo diferentes compuestos oxidados y de alto valor agregado. Varios autores han demostrado los usos de limoneno como precursor de polímeros a través de reacciones catalíticas (Gutiérrez, Rodríguez, Gracia, De Lucas, & García, 2014). Linalool y  $\beta$ -pineno son otros compuestos importantes presentes en los CEO, que fueron identificados como principios activos, con propiedades antidepresivas y sedantes utilizadas en medicina alternativa (Guzmán-Gutiérrez, Gómez-Cansino, García-Zebadúa, Jiménez-Pérez, & Reyes-Chilpa, 2012). Haselton *et al.* (2015) han demostrado que  $\alpha$ -pineno exhibió propiedades repelentes contra la mosca doméstica (*Musca domestica*) en condiciones de laboratorio. Los usos de mirceno y linalool han demostrado tener propiedades anestésicas (Taheri Mirghaed, Ghelichpour, & Hoseini, 2016).

Aunque los constituyentes de los CEO son en su mayoría monoterpenos, estos no presentan una gran actividad antioxidante según lo informado por otros autores (Ghoorchibeigi, Larijani, Aberoomand, Zare, & Mehregan, 2016). Además, diferentes estudios han demostrado que los CEO presentan actividad biológica contra una amplia gama de especies bacterianas. Randazzo *et al.* (2016) han demostrado que los monoterpenos oxigenados de los CEO son eficaces para inhibir la *Listeria monocytogenes*. Además, la actividad microbiológica de los mismos se probó contra *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Adukwu, Allen, & Phillips, 2012; Luciardi, Blázquez, Cartagena, Bardón, & Arena, 2016).

## OTROS COMPUESTOS UTILIZADOS

### TWEEN 80

El Tween 80, o monooleato de polioxietilen(80)sorbitano, es uno de los surfactantes no iónicos más utilizados en diversas industrias. Es un líquido viscoso, de color amarillento y soluble en agua.

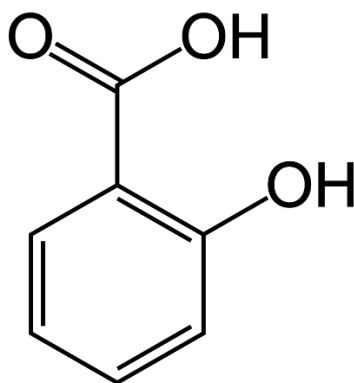


**Fig. 1.05.** Estructura de Tween 80.

Los usos del Tween 80, son de los más variados. Se utiliza en la fabricación de helados, ya que permite una mejor textura y aumenta la resistencia a la fusión del mismo (Goff, 1997). Por otro lado, puede ser utilizado para la generación de nanopartículas de oro (Premkumar, Kim, Lee, & Geckeler, 2007) o para mejorar la velocidad de disolución de compuestos de baja solubilidad (Nyström & Westerberg, 1986). Incluso, Sader *et al.* (2012) reportaron que el uso Tween 80 mejora los resultados de las pruebas de sensibilidad de concentración inhibitoria mínima de polimixina B y colistina.

### ÁCIDO SALICÍLICO

El ácido salicílico, o ácido 2-hidroxibenzoico, es un producto natural de los más conocidos, ya que es el precursor del ácido acetilsalicílico, más conocido como aspirina.



**Fig. 1.06.** Estructura de ácido salicílico.

Este ácido es biosintetizado a partir del aminoácido fenilalanina (Verberne, Budi Muljono, & Verpoorte, 1999). Es de amplio uso en la industria farmacéutica. El principal uso como aplicación tópica del ácido salicílico en dermatología es como agente queratolítico, para el tratamiento de verrugas y de hiperqueratosis localizada, o incluso en bajas concentraciones, para el tratamiento de psoriasis y acné (Bologna, Schaffer, & Cerroni, 2017). Además, hay estudios que reportan el uso de ácido salicílico como tratamiento previo o posterior a la cosecha de frutas y verduras, generando un mejoramiento en la calidad nutricional de las mismas (Soleimani Aghdam, Asghari, Babalar, & Askari Sarcheshmeh, 2016).

## PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

El uso de biopolímeros como precursores de envases es una de las alternativas al uso de polímeros sintéticos industriales, ya que son biocompatibles y biodegradables. El polisacárido quitosano ha sido ampliamente utilizado como precursor de empaque debido a su buena actividad de formación de película (Van Den Broek, Knoop, Kappen, & Boeriu, 2015). Varios estudios han demostrado que las películas a base de quitosano tienen un alto potencial para extender la vida útil de frutas y verduras, inhibiendo el crecimiento de microorganismos (Miranda-Castro, 2016; H. Wang, Qian, & Ding, 2017). La preparación de películas de quitosano sin el uso de plastificante da como resultado la obtención de películas frágiles con malas propiedades mecánicas (Epure, Griffon, Pollet, & Avérous, 2011). Se sabe que sorbitol (SB) es miscible con quitosano y puede actuar como un buen agente de reticulación. Por lo tanto, las películas preparadas junto con sorbitol tienen buenas propiedades físicas tales como la transparencia y las propiedades mecánicas (Fakhoury *et al.*, 2012).

Por otro lado, la adición de compuestos fenólicos o extractos naturales con actividad antimicrobiana y antioxidante en una matriz de quitosano mejora sus propiedades físicas de las interacciones no covalentes, como los enlaces puentes de hidrógeno. Zhang *et al.* (2015) han demostrado que vainillina actúa como un agente de reticulación en la formación de la matriz de quitosano. Además, la presencia de compuestos fenólicos como el existente en el extracto de té verde mejora las propiedades mecánicas y de barrera al vapor, así como las propiedades antioxidantes de las películas a base de quitosano resultantes (Siripatrawan & Noipha, 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes en este trabajo se propone evaluar la preparación de películas con actividad antioxidante a base de quitosano, ácido gálico y sorbitol. Varios autores han estudiado previamente el sistema quitosano-ácido gálico. Sun *et al.* (2014) han sugerido que la incorporación de ácido gálico en las películas de quitosano mejora significativamente las propiedades antimicrobianas de la película. Además, ácido gálico también mejora ciertas propiedades mecánicas, como la resistencia a la tracción o la permeabilidad al vapor de agua. De manera similar, el injerto de ácido gálico en esqueletos de quitosano implica la combinación de las propiedades de ambos reactivos, lo que resulta en una película con actividad antioxidante, que se convierte en un material adecuado para la industria alimentaria (Cho, Kim, Ahn, & Je, 2011; Xie *et al.*, 2014, 2016). Liu *et al.* (2017) han estudiado la preparación de películas de quitosano injertadas con diferentes ácidos hidroxibenzoicos y han demostrado que la película de quitosano injertada en ácido gálico tiene las mejores propiedades físicas, mecánicas y antioxidantes, utilizando glicerol como plastificante. Sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay información con respecto a las películas de quitosano incorporadas de aceites esenciales han presentado propiedades inhibitoras notables y de amplio espectro contra diferentes microorganismos que atentan contra los alimentos, así como desarrollaron mejoras en la conservación de frutas y verduras. Si bien los aceites esenciales de plantas poseen una fuerte actividad antimicrobiana, algunas desventajas de su uso para retrasar la descomposición fúngica en la fruta son su volatilidad, y una alta tasa de desaparición, además de los cambios en el olor y el sabor de la fruta, el precio y la posible fitotoxicidad (Mohammadi, Hashemi, & Hosseini, 2015).

Por lo tanto, como lo sugieren Sánchez-González *et al.* (2011), el principal beneficio de la incorporación de EO en una matriz polimérica es la reducción de su velocidad de difusión, manteniendo mayores concentraciones de compuestos activos en contacto con la superficie

de los alimentos, donde ha ocurrido o es probable que se produzca contaminación, por un período más largo.

Además, la encapsulación de EO dentro de un nanogel tiene beneficios como la liberación controlada y sostenida de una cierta cantidad de aceites del vehículo. Por definición, los nanogeles son redes de polímeros reticulados tridimensionalmente de tamaño submicrométrico. Un nanogel está compuesto de entidades de partículas de hidrogel con un espacio de tamaño nanométrico, por lo que tiene las características de hidrogel y nanopartículas mencionadas anteriormente al mismo tiempo (H. Zhang, Zhai, Wang, & Zhai, 2016). Además del aumento de la actividad antimicrobiana, las películas y nanogeles de quitosano incorporadas de aceite esencial proporcionan una película semipermeable alrededor de la superficie de frutas y verduras que puede reducir la transferencia de humedad, restringir la absorción de oxígeno, disminuir la respiración, retrasar la producción de etileno, sellar los volátiles del sabor y transportar ingredientes funcionales adicionales (antioxidantes o agentes antimicrobianos) que retrasan el crecimiento microbiano (Elsabee & Abdou, 2013). Colobatiu *et al.* (2019) investigaron la viabilidad de utilizar una formulación de película de quitosano cargada con compuestos bioactivos previamente optimizada y desarrollada, como material de apósito funcional para heridas de personas que padezcan diabetes. La formulación óptima de la película proporcionó un ambiente beneficioso para la herida húmeda, reduciendo el riesgo de deshidratación y favoreciendo el cierre de estas. Además, exhibió una buena actividad antioxidante, así como un efecto proliferativo (que representa una buena matriz para la proliferación de células de fibroblastos) y una biocompatibilidad adecuada. La evaluación *in vivo* de la formulación de película de quitosano cargada de compuestos bioactivos confirmó que la biopelícula estimuló la contracción de la herida y aceleró el proceso de curación de esta, favoreciendo una reepitelización más completa y una deposición de colágeno más densa en comparación con la formulación de referencia.

En otro aspecto, Pavinatto *et al.* (2019) desarrollaron películas a base de quitosano que contenían glicerol para el recubrimiento de frutillas, proporcionando protección física y microbiológica a la fruta. Las películas mostraron un fuerte carácter hidrófobo y una disminución de la solubilidad en medio ácido como resultado de la presencia de glicerol, que actuó como plastificante. Además, mostraron una excelente actividad bactericida y fungicida durante 1 semana, lo que se pudo verificar mediante pruebas de crecimiento bacteriano u observación visual de la ausencia de formación de hongos en las frutillas recubiertas. El

recubrimiento con películas de quitosano no alteró la apariencia, el aroma, la textura o el sabor de las frutillas, garantizando en consecuencia una buena aceptación de la fruta recubierta.

Tomadoni *et al.* (2019) aplicaron el enfoque de metodología de superficie de respuesta para determinar el contenido de vainillina y de glicerol, además de la temperatura de secado, en una formulación óptima de una película a base de quitosano. Estas películas con vainillina presentaron excelentes propiedades mecánicas, antioxidantes y de barrera deseables para ser potencialmente utilizadas en la industria del envasado de alimentos.

La incorporación de ácido siríngico, un ácido hidroxibenzoico, en una matriz polimérica a base de quitosano influyó significativamente en las propiedades físicas, propiedades mecánicas y la actividad antibacteriana de las películas de quitosano-ácido siríngico (K. Yang *et al.*, 2019). Se obtuvieron películas de mejor apariencia a la vista y una superficie lisa, las que presentaron valores de permeabilidad menores respecto a películas de quitosano puro. -además, presentaron un gran efecto bacterioestático, lo cual permitió su prueba como recubrimiento sobre huevos de codorniz, obteniéndose resultados prometedores .

Yeamsuksawat & Liang (2019) investigaron acerca de la influencia del agente de reticulación en las propiedades y la cinética de liberación del quitosano incorporado con  $\alpha$ -tocoferol. De hecho, el agente de reticulación disminuye la ligereza de la película, las propiedades de barrera a la luz y aumenta el pardeamiento de la película. Además, el agente de reticulación reduce los valores de elongación a la rotura y tensión a la tracción. Sin embargo, la hidrofobicidad y la rugosidad de la película aumentan y no existe una diferencia significativa en la barrera de vapor de agua. Estas películas reticuladas pueden ser una alternativa en el campo del envasado activo para extender la vida útil de los alimentos y evitar el deterioro de estos. Además, existen aplicaciones potenciales en los campos médico y farmacéutico en la liberación controlada de fármacos y la curación de heridas.

Por último, Wang *et al.* (2019) estudiaron la incorporación del extracto de *Herba Lophatheri* (HLE) en una película a base de quitosano, lo que condujo a cambios considerables en las propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas de dichas películas. En comparación con la película de quitosano de control, el contenido de humedad, la solubilidad en agua, el grado de hinchamiento, la permeabilidad al vapor de agua y la tasa de absorción de aceite de las películas disminuyeron notablemente. Además, aumento la actividad antioxidante de las mismas, y, por otro lado, se demostró gran espectro inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*

y *Escherichia coli*. Las películas de quitosano y este extracto mostraron un gran potencial para ser utilizadas para el envasado de alimentos, aunque aún se necesitan más estudios, como el análisis de la vida útil de los alimentos.

## CONCLUSIONES

Este capítulo se trató un primer acercamiento a los compuestos involucrados en el desarrollo de películas para la conservación de alimentos con lo que se trabajó a lo largo de toda la tesis que se presenta. Además, se presentó el estudio del arte acerca de los diferentes desarrollos existentes en películas a base de quitosano.



## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOLOGÍAS

En el presenta capítulo se describirán los materiales utilizados y las técnicas desarrolladas a lo largo de los diferentes capítulos que componen esta Tesis.

### MATERIALES

Quitosano (QS) de bajo peso molecular (~100 kDa, 40cP, Parafarm), ácido acético glacial (99,5 P/P% en peso, Cicarelli), ácido gálico (GA) anhidro (98 %, Biopack), solución acuosa de sorbitol (70 % P/P, Ingredient), ácido salicílico (>99%, Cicarelli), Tween 80 (Sigma), Reactivo de Folin Ciocalteau (Biopack), carbonato de sodio (99.5%, Cicarelli), 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich Co.), neocuproina (98%, Sigma-Aldrich Co.), cloruro de cobre (II) (99%, Cicarelli), acetato de amonio (97%, Cicarelli), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (97%, Sigma-Aldrich Co.), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS (Sigma-Aldrich Co.), cloruro férrico (Sigma-Aldrich Co.), 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina TPTZ (Sigma-Aldrich Co.) fueron los reactivos utilizados en el trabajo experimental, sin llevarse a cabo ninguna purificación adicional de los mismos.

### GRADO DE DESACETILACIÓN DE QUITOSANO

El grado de desacetilación (GD) de quitosano se cuantificó para verificar el contenido de grupos amino por unidad de masa de las muestras mediante el uso de una valoración potenciométrica. En esta cuantificación, se disolvieron 0,50 g de quitosano en 50 mL de HCl 0,30 M con agitación a 25 °C. Esta solución se tituló con una solución de NaOH 0,10 M utilizando un medidor de pH Altronix TPX-I. El valor de GD se calculó utilizando la siguiente ecuación (Czechowska-biskup, Jarosińska, Rokita, Ulański, & Rosiak, 2012):

$$GD\% = \frac{2.03 \times (V_2 - V_1)}{m + 0.0042 \times (V_2 - V_1)} \quad (2.01)$$

donde  $m$  es el peso de la muestra, y  $V_1$  y  $V_2$  corresponden a los volúmenes de NaOH empleados en los puntos de inflexión primero y segundo, respectivamente, en una función de pH versus

volumen de hidróxido utilizado en el proceso de titulación. Aplicando la ecuación 2.01, el GD fue de 86.64% obtenido por duplicado.

## PREPARACIÓN DE PELÍCULAS

La mezcla (100 g) se preparó disolviendo 1.0 g de quitosano en polvo en una solución buffer de ácido acético a pH 4 con agitación a temperatura ambiente hasta disolución total de quitosano. A continuación, se añadió a diferentes concentraciones ácido gálico como compuesto bioactivo y solución de sorbitol como plastificante, por 10 minutos y a temperatura ambiente (20-25°C), bajo agitación constante.

Una alícuota de 10 mL de la mezcla de reacción fue expandida sobre placas de Petri, obteniéndose la película a partir de la evaporación del solvente a 20 °C y 50% de humedad relativa usando una incubadora refrigerada VELP-FTC 90 durante 48 horas, a través del método "casting". En cada formulación, las películas se sintetizaron por triplicado. Una vez obtenidas las películas, y separadas de las placas, fueron utilizadas sin ser sometidas a lavado o purificación posterior.

Se debe señalar cuando se discutan las diferentes formulaciones se hará referencia a su composición original en la mezcla, que difiere de la composición final de la película, debido a la evaporación del solvente.

## CARACTERIZACIÓN DE MEZCLAS DE REACCIÓN Y PELÍCULAS

Las propiedades físicas, químicas, antioxidantes, reológicas y mecánicas de las mezclas y películas finales se analizaron como se detalla a continuación.

### ANÁLISIS REOLÓGICO

Las propiedades reológicas de las soluciones acuosas de las mezclas de reacción se analizaron mediante el uso de un reómetro (Rheoplus Physica MCR 301, Anton Paar, Alemania) equipado con una geometría cono plato CP50-1 (diámetro=50 mm, separación=50 µm) a 20 °C en un rango de velocidad de corte de 0.1 a 100 s<sup>-1</sup>. Se usó software de análisis de datos Rheoplus para obtener los datos experimentales y calcular el módulo de almacenamiento (G') y el

módulo de pérdidas ( $G''$ ). El esfuerzo cortante y la velocidad de corte se evaluaron para medir la viscosidad. Los resultados se obtuvieron como un promedio de dos mediciones.

#### *ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS*

La absorbancia de diferentes mezclas de reacción se determinó utilizando un espectrómetro UV-Vis (Shimadzu UV1800) a temperatura ambiente. Agua destilada fue utilizada para la corrección de la línea de base.

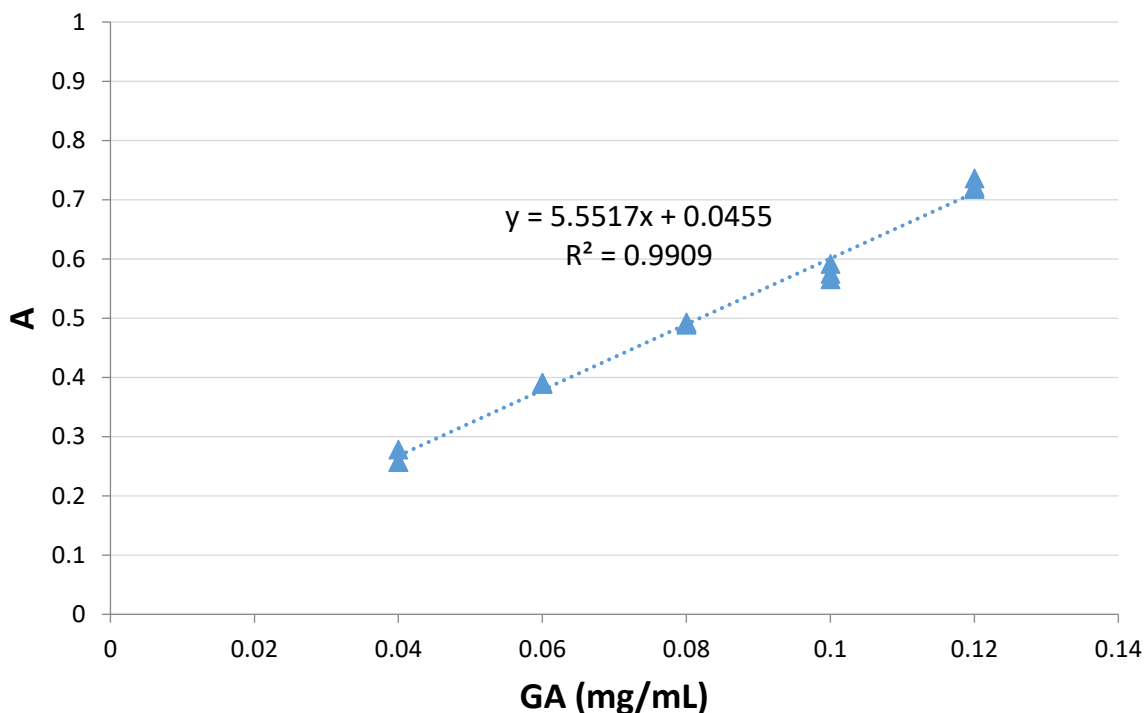
#### *ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FTIR)*

Con el fin de observar las posibles modificaciones de la interacción de los grupos funcionales de quitosano después de la incorporación de ácido gálico y sorbitol, se analizaron diferentes películas mediante espectroscopia infrarroja. Los espectros FTIR se realizaron utilizando un espectrofotómetro Nicolet 5-SXC (EE. UU.), a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en un rango de (4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ ), utilizando aire como background. Para realizar el procedimiento experimental, las películas fueron colocadas de tal modo que el haz pase a través de ellas.

#### *ENSAYOS ANTIOXIDANTES*

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El contenido total de fenoles (TPC) de las películas se determinó a partir de la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, lo que resultó en una coloración azul determinada espectrofotométricamente aplicando el procedimiento de Ivanova *et al.* (Ivanova *et al.*, 2011) con ligeras modificaciones. Aquí, se preparó un extracto para realizar este ensayo a partir de una relación de 25 mg de película y 3,0 mL de agua destilada, que se dejó a  $25\text{ °C}$  durante 2 horas. Finalmente, se mezcló una alícuota de 1,0 mL de este extracto con 5 mL de agua destilada y 0,2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu en un tubo de ensayo y se dejó reposar durante 3 minutos. Después de eso, se agregaron 1,5 mL de solución acuosa de carbonato de sodio (5% p/p) y se llevó a un volumen

final de 10,0 mL con agua destilada. La mezcla se llevó a un baño de ultrasonido a 50°C durante 20 minutos. La absorbancia de esta mezcla se midió a 765 nm utilizando el espectrofotómetro UV-Visible. El total de compuestos fenólicos presentes en las películas se expresó como mg de ácido gálico por mg de película a partir de la generación de una curva patrón (Figura 2.01)

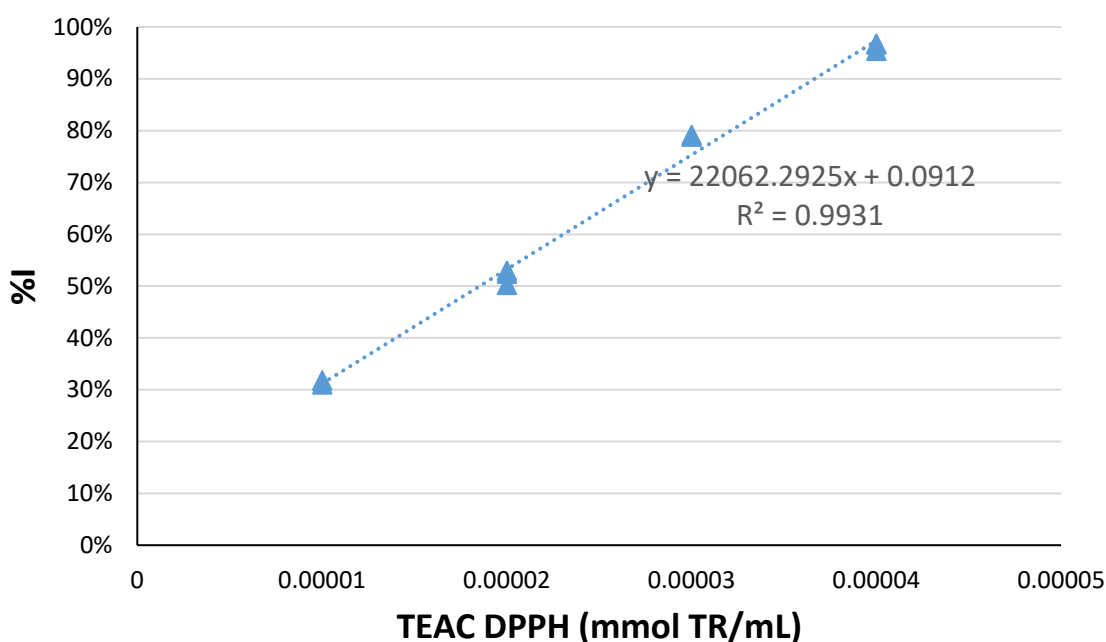


**Fig. 2.01.** Curva de calibración para TPC

El ensayo de capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) determina el grado de decoloración que provocan los componentes de un extracto a una solución metanólica de dicho reactivo, cuantificando de esta manera la capacidad captadora de radicales libres del extracto, y en este caso fue determinado de acuerdo con Siripatrawan & Harte (2010). En este sentido, 3 mL de cada extracto obtenido siguiendo el mismo procedimiento que en el TPC, se mezclaron con 1 mL de solución metanólica de DPPH (20% p/v). Esta mezcla fue agitada utilizando un agitador Vortex y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Ante la presencia de actividad antioxidante, se observó un cambio de color de la solución que viró de violeta a amarillo pálido y se midió la absorbancia de esta a 517 nm, y se determina el % de inhibición a través de la ecuación:

$$\%I = 1 - \frac{A_{muestra}}{A_{control}} \quad (2.02)$$

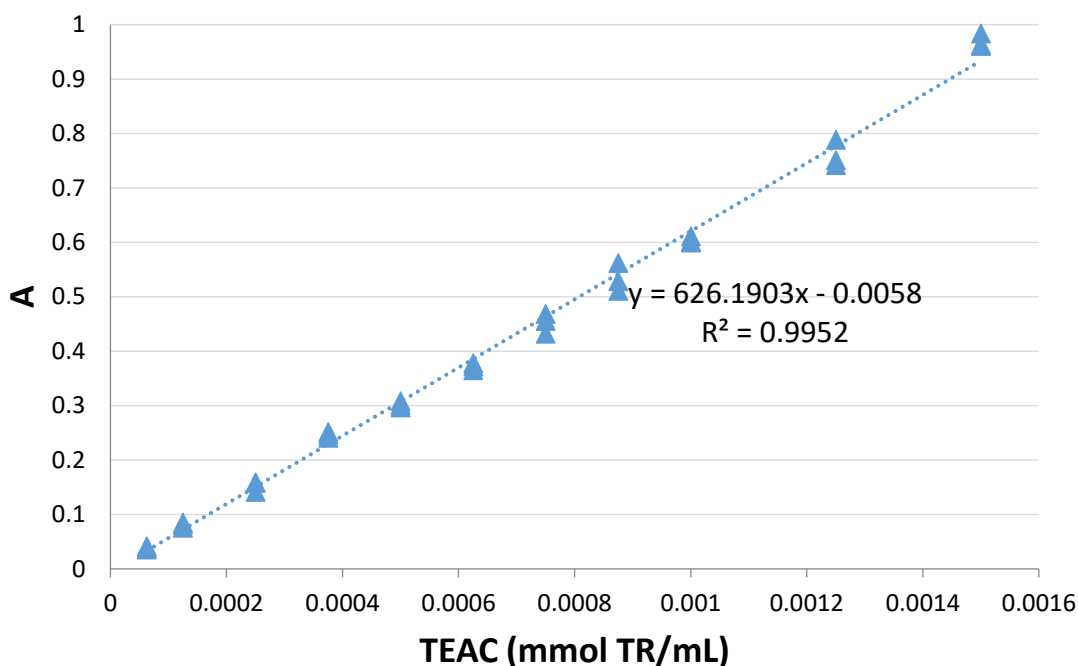
La capacidad antioxidante de DPPH de las películas se ha cuantificado como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), lo que implica que la capacidad antioxidante de la muestra se midió y comparó con la capacidad antioxidante determinada por el estándar Trolox a partir de una curva de calibración (Figura 2.02)



**Fig. 2.02.** Curva de calibración para DPPH

El método de la capacidad antioxidante reductora del cobre (CUPRAC, por sus siglas en inglés) para la determinación de actividad antioxidante se basa en la medición de la absorbancia a 450 nm del cromóforo [Cu(I)-Nc quelato] formado como resultado de la reacción redox de antioxidantes con el reactivo CUPRAC [Cu(II)-Nc]. En esta tesis se siguió la metodología de Apak *et al.* (Apak, Güçlü, Ozyürek, & Karademir, 2004) con ligeras modificaciones. Este método se basa en la medición de la absorbancia a 450 nm del cromóforo CUPRAC [quelato de Cu(I)-Neocuproína] formado como resultado de la reacción redox de los antioxidantes con el reactivo CUPRAC [Cu(II)-Neocuproína]. En un tubo de ensayo se agregaron 1,0 mL de solución de cloruro de cobre (II) (0,01 M), 1.0 mL de neocuproína (0,0075 M) y 1,0 mL de solución buffer de acetato de amonio a pH 7. Para obtener un volumen final de 4,10 mL, se agregaron

diluciones de los diferentes extractos de las películas. Los tubos se cerraron y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Ante la actividad antioxidante, se pudo determinar un viraje de color de azul pálido a naranja. Como en el método DPPH, el método CUPRAC se cuantificó como TEAC, siguiendo la misma metodología para la obtención de una curva de calibración (Figura 2.03).



**Fig. 2.03.** Curva de calibración para CUPRAC

Los valores de DPPH y CUPRAC para películas se expresaron como mmol de Trolox por miligramo de peso seco de la película, a partir de los datos conocidos entre la relación de mg de película y mL de extracto utilizado.

### ENSAYOS MECÁNICOS

Para el análisis de la resistencia mecánica de las películas se determinaron tres pruebas diferentes. La primera, tiene que ver con la resistencia a la tracción que presenta la película en el momento en que se desgarran y que se denomina Resistencia a la Tracción (Tensile Strength - TS). La segunda, el alargamiento a la rotura que se determina a partir de la relación entre la elongación que presenta la película en el momento de la ruptura o desgarramiento y la longitud inicial de la muestra de prueba, y que se lo denomina Elongación a la Rotura

(Elongation at Break - EB). Por último, el módulo de Young (E) de las películas indica la relación entre el esfuerzo y la elongación en la deformación elástica de un cuerpo sólido y se considera otro parámetro valioso de las propiedades mecánicas de las películas. Estas pruebas se llevaron a cabo al menos por triplicado para una muestra rectangular (25x100 mm) de acuerdo con el método estándar ASTM D882-12 (2012) utilizando una máquina de ensayo universal Instron (modelo 3342, Norwood, MA, EE. UU.), equipada con una celda de carga de 500 N, y realizando el ensayo a una velocidad de 0.5 mm/s a 25°C. Los espesores de las películas fueron medidos a partir de la utilización de un micrómetro, y fueron utilizados dentro de las fórmulas de cálculo con el promedio de al menos 10 mediciones. Los valores de TS, EB y E de la película se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones, respectivamente:

$$TS = F_{max}/S \quad (2.03)$$

$$EB = (\Delta L/L) \quad (2.04)$$

$$E = (F/S)/(\Delta L/L) \quad (2.05)$$

donde  $F_{max}$  es la carga máxima en el punto de ruptura;  $S$  es el área de la sección transversal original;  $\Delta L/L$  es la relación de la extensión de la película donde  $L$  es la longitud inicial de la película; y  $F$  es la carga de un punto en la porción lineal inicial de la curva de tensión-deformación.

#### OPACIDAD

La opacidad de la película (O) se calculó de acuerdo con Park & Zhao (2004) por triplicado a partir de la siguiente ecuación:

$$O = A_{600}/x \quad (2.06)$$

donde  $A_{600}$  es la absorbancia de la película a 600 nm, la cual fue colocada de manera directa en espectrofotómetro, sin la utilización de ninguna cubeta o contenedor, y donde  $x$  es el espesor promedio de la película, medido a partir de la utilización de un micrómetro.

### *TASA DE TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA (WVT)*

La tasa de transmisión de vapor de agua (WVT, por sus siglas en inglés) y la permeabilidad de la transmisión de vapor de agua (P) de las películas se determinaron de acuerdo con el Procedimiento del Método del Agua explicado en la norma ASTM E96/E96M-16 (2016).



**Fig. 2.04.** Dispositivo para la determinación de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVT) y permeabilidad.

Para ello, se llenó con agua (a una temperatura de 20 °C) el dispositivo de la Figura 2.04, asegurándose que entre el agua y la muestra quede una capa de aire que permita la transmisión del vapor de agua y, además, que la película no entre con contacto directo con la misma. Se arma el dispositivo de tal manera que quede bien sellado, se pesa el sistema completo, y se lo lleva a la incubadora previamente descrita en la preparación de películas, en donde se cuenta con una temperatura seteada por defecto (20 °C) y en donde se controla la humedad interior a partir de una mezcla glicerina/agua. Cada intervalo de tiempo constante, se realizan los pesajes del sistema completo, y con esos datos se calcularon los valores de los ensayos a partir de las siguientes ecuaciones:



$$WVT = G/(t \times A) \quad (2.07)$$

$$P = (WVT/\Delta p) \times x \quad (2.08)$$

donde  $G$  es la pendiente correspondiente a la curva peso frente al tiempo en gramos;  $t$  es el tiempo en horas;  $A$  es el área de la boca de la cápsula de prueba en  $m^2$ ;  $\Delta p$  es la diferencia de presión de vapor; y  $x$  es el espesor promedio de la película.

### *MICROSCOPIA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)*

La morfología de las superficies de las diferentes películas fue examinada utilizando microscopía de barrido electrónico SEM (Phenom Pure, Eindhoven, The Netherlands) con un voltaje de aceleración de 5kV.

### *ANÁLISIS DEL COLOR*

El color de diferentes películas se determinó mediante el uso de un colorímetro Minolta CR-400 (Japón), que permitió determinar los valores de  $L^*$  (brillantez),  $a^*$  (oscilaron entre rojo y verde) y  $b^*$  (oscilaron entre amarillo y azul) en cada película por triplicado. Estos valores pertenecen al espacio de color CIE Lab, un sistema de medición de color propuesto en 1971 por la Comisión Internationale de l'Éclairage (CIE). Al realizar la medición, los colores deben verse sobre un fondo que vaya de blanco a gris medio por un observador adaptado a un iluminante que no sea demasiado distinto a la luz natural del medio día.

Además del análisis de los valores anteriores, también se calculó la diferencia de luminosidad  $\Delta E^*$  (Ecuación 2.09), que permite establecer diferencias entre distintas mediciones. Para ello, los valores de diferencia de luminosidad fueron determinados comparando cada una de las muestras contra una muestra patrón. El cálculo se realiza mediante la fórmula:

$$\Delta E^* = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (2.09)$$

## ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD

Se ensayó a escala laboratorio el proceso de degradación de diferentes películas en la microflora natural del suelo (Pereda, Moreira, Roura, Marcovich, & Aranguren, 2014). El ensayo fue realizado directamente en suelo, en dos sitios con diferente contenido de humedad, sin incorporación de microflora adicional ni agregado de suelo fértil. Las películas fueron preparadas en forma circular, con un diámetro de 5 cm. Cada película ensayada fue preparada por triplicado. Una malla de acero inoxidable sirvió de soporte y cobertura de estas, ya que permiten el acceso de los microorganismos y la humedad y las muestras degradadas pueden ser fácilmente extraídas para realizar los ensayos de control. Estas mallas que contuvieron las películas fueron enterradas a una profundidad de 5 cm, lo cual permite la degradación aeróbica de las mismas. Durante el ensayo, la temperatura durante el día osciló entre los 20 y 25 °C, y no se registraron lluvias. El ensayo fue llevado a cabo durante 28 días, en donde periódicamente, las películas fueron desenterradas, limpiadas manualmente para extraer todo rastro de tierra y pesadas, para determinar la pérdida de peso de estas.

## METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La Metodología de Superficies de Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta.

Cuando decimos que el valor real esperado,  $\eta$ , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de  $k$  factores cuantitativos,  $X_1, X_2, \dots, X_k$ , esto significa que existe alguna función de  $X_1, X_2, \dots, X_k$  (que se supone continua en esos valores) que proporciona el correspondiente valor de  $\eta$  para alguna combinación dada de niveles:

La relación existente entre  $\eta$  y los niveles de los  $k$  factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo  $(k+1)$ -dimensional) a la que llamaremos superficie de respuesta.

Al hablar de metodología de superficie de respuesta, debemos tener en claro los siguientes conceptos:

- Factores: Son las condiciones del proceso que influyen la variable de respuesta. Estos pueden ser cuantitativos o cualitativos.
- Respuesta: Es una cantidad medible cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores. El interés principal es optimizar dicho valor.
- Función de respuesta predicha: La función de respuesta se puede representar con una ecuación polinomial. El éxito en una investigación de una superficie de respuesta depende de que la respuesta se pueda ajustar a un polinomio de primer o segundo grado.
- Superficie de respuesta: La relación  $Y=f(x_1, x_2, \dots, x_k)$  entre  $Y$  y los niveles de los  $k$  factores  $x_1, x_2, \dots, x_k$  representa una superficie. Con  $k$  factores la superficie está en  $k+1$  dimensiones. Por ejemplo, cuando se tiene  $Y=f(x_1)$  la superficie está en dos dimensiones, mientras que si tenemos  $Y=f(x_1, x_2)$  la superficie está en tres dimensiones.

## DISEÑOS EXPERIMENTALES

El ajuste y análisis de una superficie de respuesta se facilita con la elección apropiada de un diseño experimental. Un diseño es el conjunto específico de combinaciones de los niveles de las  $k$  variables que se utilizara al llevar a cabo el experimento.

La elección de un diseño adecuado del experimento a realizar es fundamental para modelar y explorar la superficie de respuesta usada para ajustar un modelo polinómico al conjunto de datos recogidos en los puntos del diseño. Así pues, sería deseable que el diseño tuviera alguna de las siguientes características:

1. Generar una distribución razonable de puntos y, por tanto, de información, en toda la región de interés, pero utilizando el menor número posible de puntos experimentales.
2. Asegurar que, para cada punto  $x$ , el valor ajustado está tan cerca como sea posible del valor real.
3. Permitir la detección de falta de ajuste en el modelo.
4. Permitir la ejecución de los experimentos en bloques.

5. Permitir la construcción secuencial de diseños de orden creciente.
6. Proporcionar una estimación interna de la varianza del error.
7. Asegurar simplicidad en los cálculos de las estimaciones de los parámetros del modelo.

Además de las propiedades mencionadas, sería muy conveniente que el diseño elegido fuera ortogonal, lo que implica que los términos del modelo ajustado son sin correlación y, por tanto, también las estimaciones de los parámetros lo son.

Teniendo en cuenta que el objetivo de la RSM es la optimización de la respuesta y que se desconoce la localización del óptimo antes de ejecutar el experimento, esta propiedad resulta muy interesante, puesto que garantiza que el diseño proporciona estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones.

### *DISEÑO DOEHLERT*

Un diseño experimental alternativo y muy útil para los modelos de segundo orden es el diseño de caparazón uniforme propuesto por Doehlert (1970). Los diseños Doehlert se aplican fácilmente para optimizar las variables y ofrecen ventajas en relación con otros tipos de diseños, como los diseños compuestos centrales o los diseños de Box-Behnken, ya que necesitan menos experimentos, que son más eficientes y pueden moverse a través del dominio experimental.

El diseño de Doehlert describe un dominio de experimentación esférico y enfatiza la uniformidad en el relleno del espacio. Aunque esta matriz no es ni ortogonal ni giratoria, no difiere significativamente de la calidad requerida para un uso efectivo. Para dos variables, el diseño de Doehlert consiste en un punto central y seis puntos que forman un hexágono regular y, por lo tanto, se ubican en un círculo. En tres dimensiones se puede ver de diferentes maneras, dependiendo de la estructura geométrica seleccionada. En los diseños de Doehlert, el número de niveles no es el mismo para todas las variables. En un diseño Doehlert de dos variables, por ejemplo, una variable se estudia en cinco niveles mientras que la otra se estudia en solo tres niveles. Esta propiedad permite una libre elección de los factores que se asignarán a un número grande o pequeño de niveles. Se pueden utilizar diferentes criterios para asignar los factores. Como regla general, es preferible elegir la variable con el efecto más fuerte como el factor con cinco niveles para obtener la mayor información del sistema.

## OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Las frutas de pomelo (*Citrus paridisi*), limón (*Citrus lemon*), mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*) se adquirieron en mercados locales de Argentina y Estados Unidos. El origen del material fue la Región del Litoral de Argentina (AR) y el Estado de California de Estados Unidos (EE. UU.). Además, aceites esenciales puros y comerciales (CM) de pomelo, limón, mandarina y naranja se compraron a Plant Essential Oils (California, EE. UU.). Estos aceites fueron utilizados sin ninguna purificación posterior. Los aceites esenciales fueron extraídos de las cáscaras de las frutas, peladas manualmente. Para mejorar el rendimiento de la extracción, las cáscaras que se utilizaron fueron molidas (Allaf, Tomao, Besombes, & Chemat, 2013). Los aceites esenciales cítricos se extrajeron por hidrodestilación utilizando un aparato del tipo Clevenger durante dos horas, y luego, fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

## CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

### CROMATOGRAFÍA EN FASE GASEOSA CON ESPETROMETRÍA DE MASAS

El perfil químico de los aceites esenciales se analizó utilizando un cromatógrafo de gases (Agilent 6890, EE. UU.) acoplado a un detector de espectrometría de masas (MS) y un detector de ionización de llama (FID). Se utilizaron dos columnas capilares para cada detector (columna HP-5, 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 mm de espesor de recubrimiento). Se utilizó el gas portador helio con un caudal de 0.9 mL/min. La ionización del analito se realizó por impacto de electrones a 70 eV. Los datos espectrales de masas se adquirieron en el modo de exploración en el rango de 35–450 m/z. El horno fue programado a una temperatura de 60 °C durante 5 min y de 60 a 200 °C con una velocidad de 4 °C/min. Para llevar a cabo la caracterización mediante la MS, el inyector y el detector se mantuvieron a 200 y 280 °C, respectivamente. La temperatura del FID se mantuvo a 220 °C. El índice de retención (RI) se calculó utilizando una serie de n-alcenos (8-20 átomos de carbono) en ambas columnas conectadas a MS y FID. Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención y sus espectros de masas con los de la literatura (Adams, 2007) y mediante bibliotecas (Wiley275.L).

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las propiedades de captación de radicales tienen una importancia significativa para la defensa antioxidante de los consumidores. Muchos ensayos de antioxidantes se basan en la reacción de transferencia de electrones que determina un cambio de color cuando se reduce el antioxidante. En este contexto, ABTS, FRAP, DPPH y CUPRAC fueron los ensayos estudiados en este trabajo para evaluar la actividad antioxidante de cada aceite esencial cítrico.

El ensayo de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) se realizó de acuerdo con la metodología empleada por Re *et al.* (1999) con ligeras modificaciones. En resumen, se diluyeron 1,30 mL de reactivo ABTS (Sigma, EE. UU.) en 100 mL de etanol hasta alcanzar una absorbancia entre 0,65 y 0,70. Luego, se mezclaron 10 µL de los aceites esenciales con 990 µL del reactivo diluido. La absorbancia se midió a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible modelo HP 8453. La capacidad antioxidante ABTS de los aceites esenciales cítricos se cuantificó como capacidad antioxidante equivalente en Trolox (Sigma, EE. UU.) (TEAC) y se expresó como mg TR/mL CEO, según la curva de calibración que se muestra en la Figura 2.05.

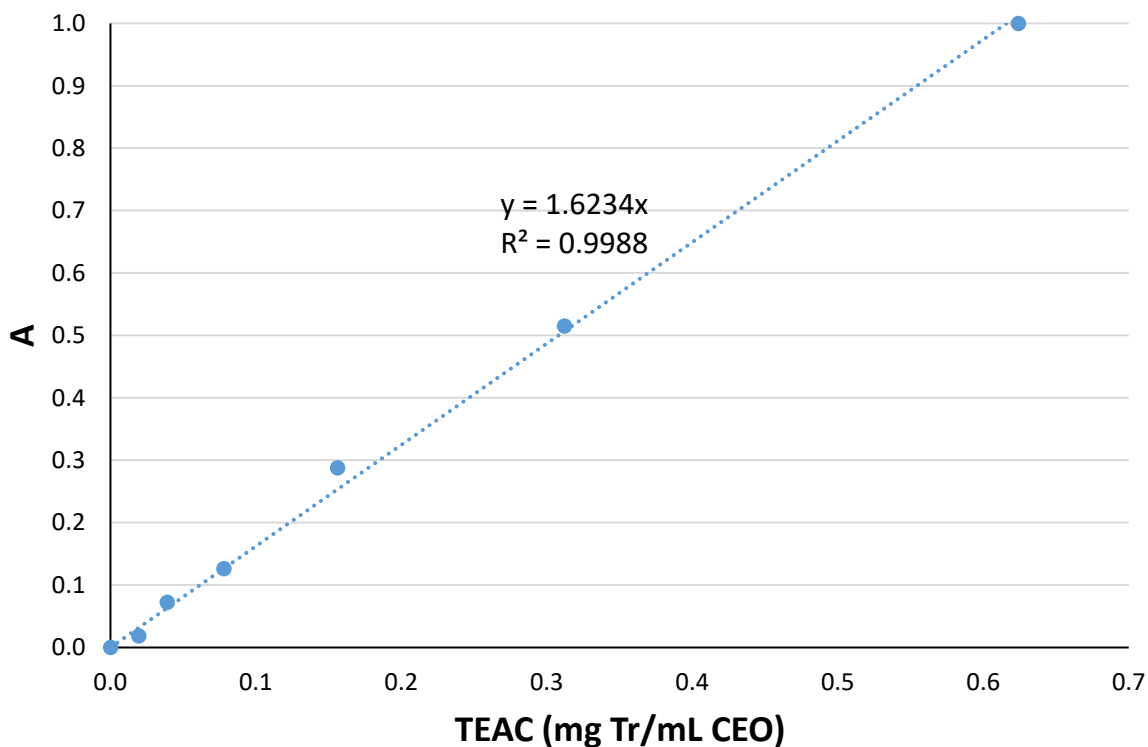
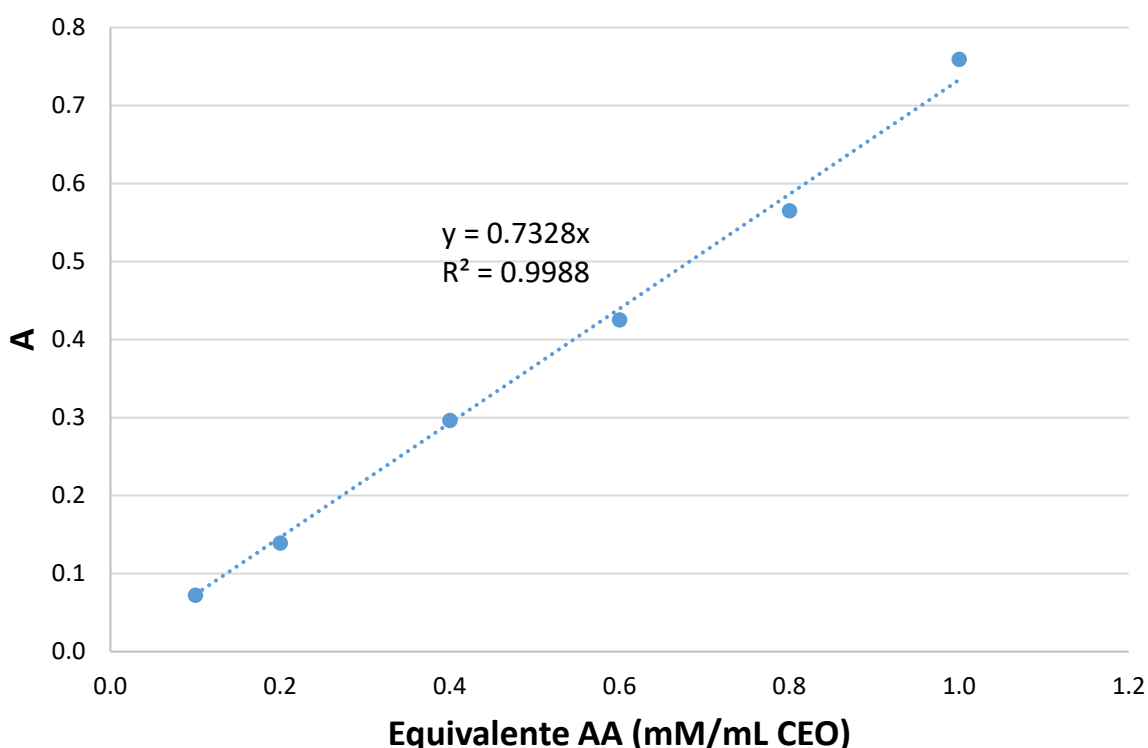


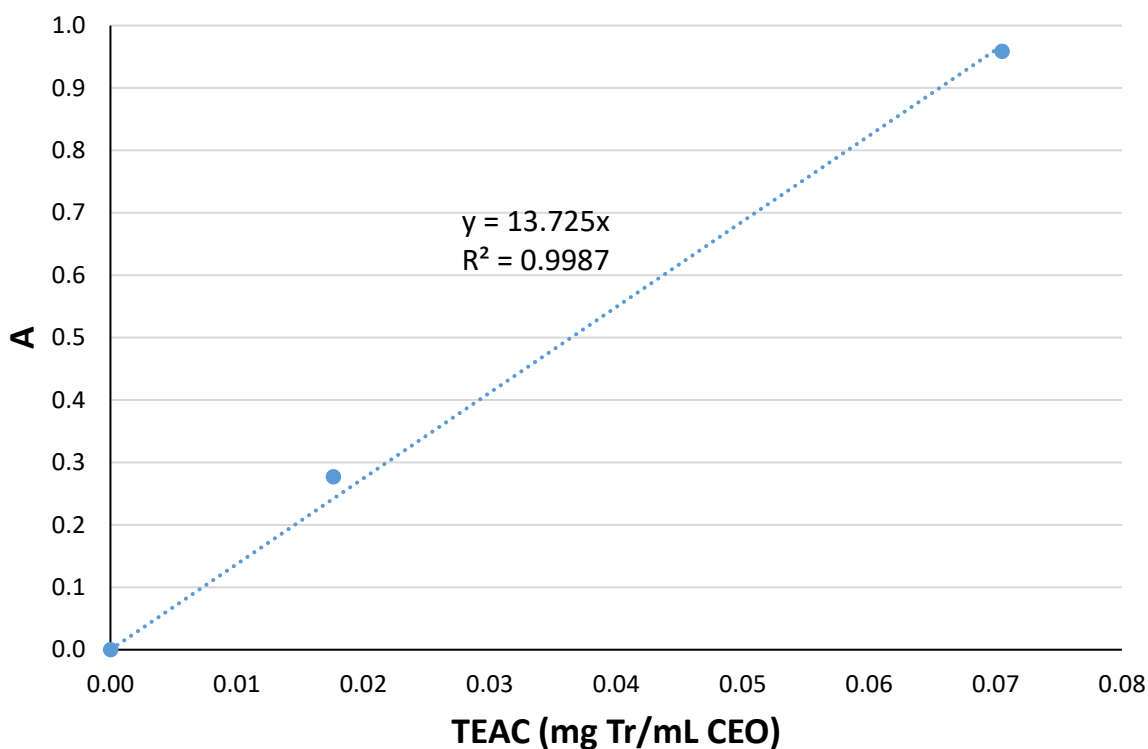
Fig. 2.05. Curva de calibración para ABTS

El Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP) mide la capacidad de los antioxidantes para reducir hierro (III) en un medio ácido. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con Benzie y Strain (1996). En este sentido, 10  $\mu\text{L}$  de aceite esencial y 990  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP (cloruro férrico y TPTZ (2,4,6-Tris-(2-piridil)-s-triazina)) (Sigma, EE. UU.) en buffer de acetato a pH 3.6 se colocaron en un tubo de reacción. Los valores de FRAP se calcularon a partir del valor de absorbancia a 593 nm y relacionándolo con una solución estándar antioxidante de ácido ascórbico (Sigma, USA). Se realizó una curva de calibración con diluciones en serie de ácido ascórbico (AA) para determinar la actividad antioxidante equivalente de ácido ascórbico expresada como mM AA/mL CEO (Figura 2.06).



**Fig. 2.06.** Curva de calibración para FRAP

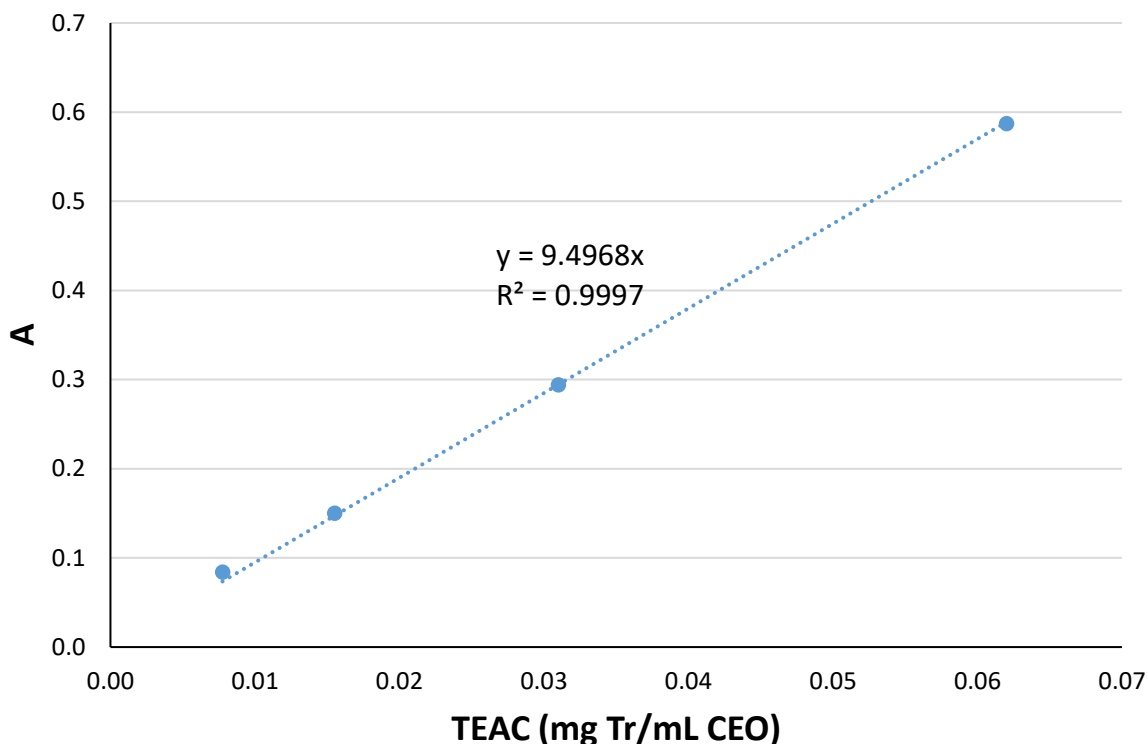
El ensayo DPPH se determinó de acuerdo con Siripatrawan y Harte (2010), donde el radical cromógeno púrpura 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH) (Sigma, EEUU) se reduce con un antioxidante a la hidrazina de color amarillo pálido. En resumen, 60  $\mu\text{L}$  de aceite esencial cítrico se mezclaron con 240  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH y se incubó durante 30 minutos. La capacidad de eliminación se midió a 517 nm. Como en el ensayo ABTS, la actividad antioxidante DPPH de los aceites esenciales cítricos se cuantificó como TEAC y los resultados se expresaron como mg TR/mL CEO, a partir de la curva de calibración de la Figura 2.07.



**Fig. 2.07.** Curva de calibración para DPPH

La Capacidad Antioxidante de Reducción Cúprica (CUPRAC) se determinó de acuerdo con Apak *et al.* (Apak *et al.*, 2004) con ligeras modificaciones. En resumen, 70  $\mu$ L de solución de cloruro de cobre (II) 0,01 M, 70  $\mu$ L de neocuproína 0,0075 M, 70  $\mu$ L de solución buffer de acetato de amonio (Sigma, EE. UU.) y las diluciones de la muestra para alcanzar un volumen final de 300  $\mu$ L, se agregaron a un tubo de ensayo. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se obtuvo un cambio de color de azul pálido a naranja. La absorbancia a 450 nm se midió contra un blanco de reacción y los resultados se cuantificaron como TEAC y expresaron como mg TR/mL CEO (Figura 2.08).





**Fig. 2.08.** Curva de calibración para DPPH

#### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Todos los aceites esenciales cítricos fueron evaluados inicialmente para medir su actividad antibacteriana por el método de difusión en disco (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013). Este análisis se llevó a cabo utilizando: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) como potencial bacteria patógena; *Leuconostoc mesenteroides* MS1 (Gram-positivo) como una bacteria transmitida por los alimentos que se aisló a partir de salchichas industriales (Serra, Garnero, Nicolau, & Andreatta, 2018); y *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014 (Gram-positivo) como una bacteria beneficiosa. *Lactobacillus plantarum* ES147 pertenece a la colección de cultivos de ICYTAC (Córdoba, Argentina) y se aisló a partir de cereal en bruto (Salvucci, LeBlanc, & Pérez, 2016). *Escherichia coli*, *Leuconostoc mesenteroides* MS1 y *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014 fueron cultivadas en triptona de soja durante 24 horas a 37 °C, en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante 48 horas a 30 °C, y en caldo MRS durante 24 horas a 37 °C, respectivamente. Luego, las placas triptona de soja-agar (*E. coli*) o las placas MRS-agar (*L. mesenteroides* y *L. plantarum* ES147 y ATCC 8014) se inocularon con el inóculo bacteriano respectivo. La inoculación se preparó siguiendo el método de

suspensión directa de colonias en una solución salina para obtener una absorbancia de 0,5 en la escala de McFarland, que es aproximadamente equivalente a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Se colocaron diez  $\mu\text{L}$  de cada aceite esencial cítrico en un disco de papel estéril de 5 mm de diámetro (125 mm, Munktell) que se transfirió a la placa de agar inoculada. Las pruebas se realizaron por triplicado. Las placas de agar se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas para *E. coli* y *L. plantarum* ES147 y ATCC 8014 y a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas para *L. mesenteroides*. Los diámetros de la zona de inhibición se midieron incluyendo el disco de papel (5 mm). Los controles positivos fueron implementados con el antibiótico comercial gatifloxacina (Gatif Forte, Poen, 0,50% p/p) y sus diluciones, que exhiben acción antibacteriana contra una amplia gama de bacterias aeróbicas Gram-positivas y Gram-negativas; también con Hipoclorito de sodio (Ayudín, 2,5 % p/p); y alcohol etílico (Porta, 96% v/v). Para los controles negativos, se utilizaron aceite de girasol (AGD SA, Argentina, 100%) y lecitina de soja granulada (Modelife, 70% p/p).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche. La concentración bactericida mínima (CBM) se considera como la menor concentración de agente antimicrobiano que va a prevenir el crecimiento de un organismo después del subcultivo en un medio libre de antibiótico (Andrews, 2002). La CIM y la CBM de los aceites esenciales cítricos más activos se determinaron mediante el uso de un método de dilución en serie de caldo triptona de soja para *E. coli*. Se preparó una solución madre de cada aceite esencial cítrico que contiene 1 mL de aceite esencial más 5 mL de lecitina de soja (2% p/p) para facilitar la solubilización. La concentración máxima inicial de cada aceite esencial cítrico fue de 0,125 g/mL (pomelo EO US), 0,14 g/mL (limón EO US) y 0,12 g/mL (limón EO AR) y finalmente se diluyeron a una concentración mínima de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL y 0,3 mg/mL, respectivamente, también con lecitina. Cada tubo se inoculó con asa de suspensión bacteriana, preparado como se describe antes, para lograr una concentración final de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de concentración. Los tubos se inocularon a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas junto con un tubo de control sin aceite esencial cítrico. La supervivencia o no se determinó colocando una alícuota de cada tubo en placas triptona de soja-agar.

### *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PELÍCULAS*

Todas las pruebas de actividad antimicrobiana de películas fueron realizadas de manera similar a lo anteriormente planteado, con la diferencia de que, en vez de embeber un disco con un medio líquido, fue utilizado directamente un disco que fue cortado directamente de la película. Para asegurar la inocuidad de estos, fueron esterilizados con luz ultravioleta durante 10 minutos por cada lado.

### *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software InfoStat (Córdoba, Argentina). El análisis de conglomerados se realizó basándose en la distancia euclidiana, utilizando el método de enlace promedio con un número máximo de conglomerados establecido arbitrariamente en dos. El clúster se realizó utilizando la composición química del aceite esencial cítrico como variable. El análisis de varianza (ANOVA,  $\alpha = 0.05$ ) y la prueba DGC se realizaron para determinar las diferencias significativas entre las medias en los ensayos de antioxidantes. La variabilidad entre los diferentes aceites esenciales cítricos y los resultados de los ensayos de antioxidantes y el análisis antimicrobiano se realizó con un análisis multivariado en los componentes principales (PC).



## CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO, ÁCIDO GÁLICO Y SORBITOL

En este capítulo se presenta la formación de películas a base de quitosano adicionadas con ácido gálico y sorbitol, donde este último actúa como plastificante. Primeramente, se menciona un análisis exploratorio de las películas obtenidas evaluando las actividades antioxidantes y propiedades mecánicas adecuadas para posteriormente utilizar la metodología de superficie de respuesta (RSM) para modelar las respuestas experimentales y obtener la optimización de la película.

### ANÁLISIS EXPLORATORIO

En primera instancia, se realizó un estudio preliminar en 25 películas sintetizadas a partir de 1% P/P de solución acuosa de quitosano con la combinación de (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0)% P/P de sorbitol y (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00)% P/P de ácido gálico (Tabla 3.01). A partir de estos resultados, se realizó un diseño experimental como se explica más adelante en este capítulo.

**Tabla 3.01.** Formulaciones de películas a base de quitosano al 1% P/P con el agregado de ácido gálico (GA) y sorbitol (SB).

N°	%GA	%SB	N°	%GA	%SB	N°	%GA	%SB
1	0	0	11	0	5	21	0	10
2	0.25	0	12	0.25	5	22	0.25	10
3	0.5	0	13	0.5	5	23	0.5	10
4	0.75	0	14	0.75	5	24	0.75	10
5	1	0	15	1	5	25	1	10
6	0	2.5	16	0	7.5			
7	0.25	2.5	17	0.25	7.5			
8	0.5	2.5	18	0.5	7.5			
9	0.75	2.5	19	0.75	7.5			
10	1	2.5	20	1	7.5			

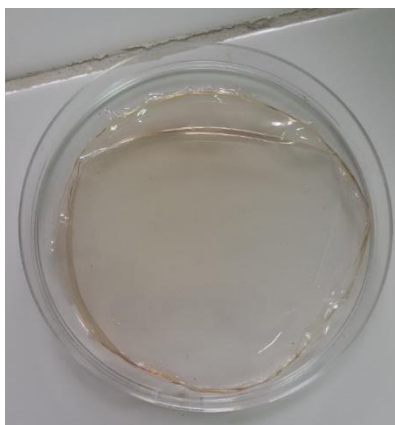
## CARACTERIZACIONES DE MEZCLAS Y PELÍCULAS

Las mezclas de reacción previas a someterlas a casting presentaron una apariencia homogénea, y la presencia de una tonalidad del color violeta, que se dio luego de la adición de ácido gálico, tal como muestra la Figura 3.01.



**Fig. 3.01.** Mezcla de reacción conteniendo quitosano, sorbitol al 5% en peso y ácido gálico 0,75% en peso.

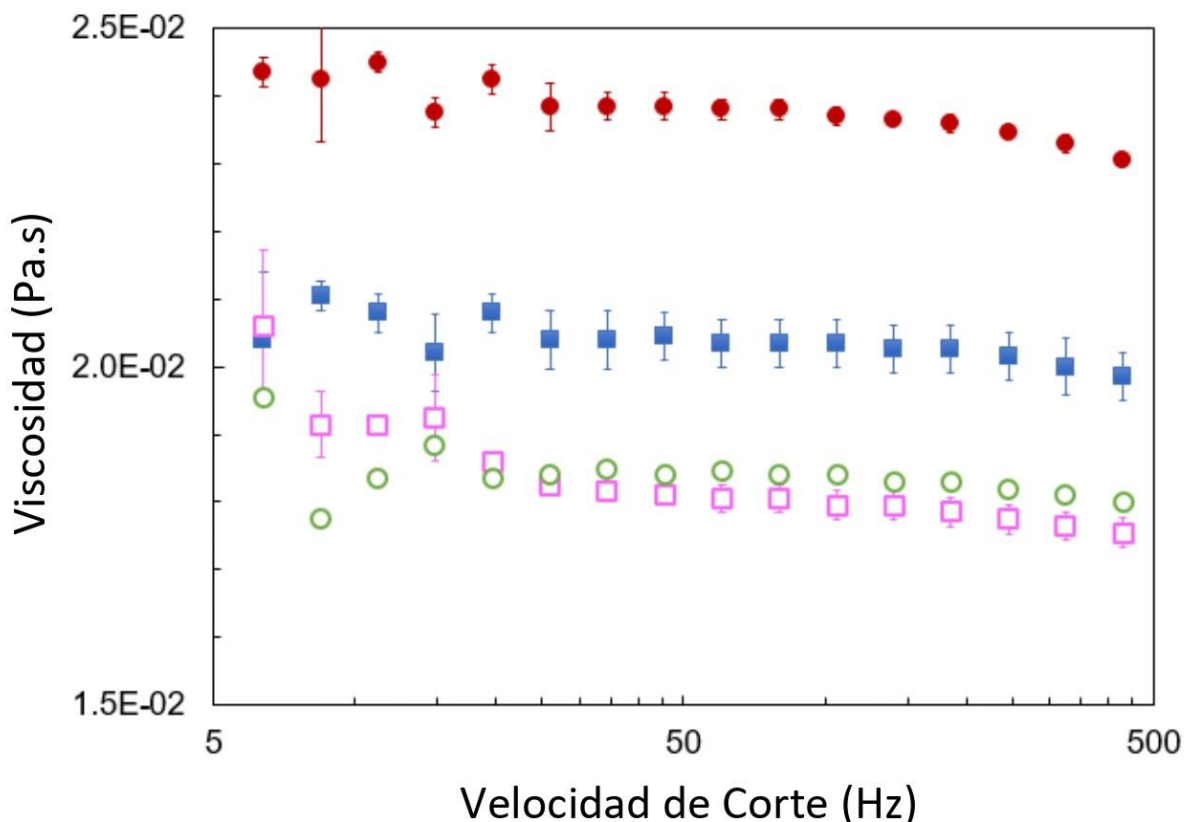
La Figura 3.02 corresponde a una película obtenida post casting, la cual presenta una muy buena apariencia, teniendo en cuenta su homogeneidad, transparencia y brillo, además de presentar suavidad al tacto.



**Fig. 3.02.** Película conteniendo quitosano, sorbitol al 5% en peso y ácido gálico 0,75% en peso.

Las mezclas utilizadas para sintetizar las películas finales se sometieron a ensayos reológicos mediante el uso de ensayos rotacionales a 20,00 °C. La Fig. 3.03 muestra el perfil de la curva de viscosidad de corte en función de la velocidad de corte para la mezcla con 1% P/P de quitosano, 5% P/P de sorbitol y 1% P/P de ácido gálico, y para quitosano puro o quitosano más ácido gálico o quitosano más sorbitol, en las mismas concentraciones. Se encontró que, en el rango de velocidad de corte entre 20 y 350 Hz, el perfil de las curvas se asemeja a las de un líquido viscoso ideal donde la presencia de sorbitol o ácido gálico modifica ligeramente la viscosidad de quitosano en esas condiciones.

Este comportamiento es compatible con el hecho de que estas moléculas interactúan con los esqueletos de quitosano por enlace del tipo puente de hidrógeno o interacción electrostática. Además, la mezcla quitosano/sorbitol exhibe una viscosidad (cerca de 24 mPa.s) mayor que la medida para la solución acuosa de quitosano (cerca de 20 mPa.s). Teniendo en cuenta que sorbitol tiene seis grupos hidroxilo, puede formar enlaces de hidrógeno con las cadenas quitosano y actuar como un agente entrecruzante de la reticulación no covalente de las estructuras del polisacárido. Este fenómeno produce una aglomeración de las cadenas de quitosano, lo que conduce a un aumento de la viscosidad del sistema. Por otro lado, cuando se incorpora ácido gálico en la solución acuosa de quitosano, se produce una disminución de la viscosidad del sistema (cerca de 18 mPa.s). Probablemente, el anión acetato contra el grupo amonio de quitosano está sustituido por el anión de ácido gálico de la interacción electrostática, produciendo un volumen hidrodinámico más pequeño de cadenas de quitosano. Además, la mezcla de quitosano que contiene ácido gálico y sorbitol tiene un valor de viscosidad (cerca de 19 mPa.s) inferior a la solución acuosa de quitosano, pero mayor que la encontrada para la mezcla de quitosano/ácido gálico. Esta tendencia apoya el hecho de que, en estas condiciones, ácido gálico interactúa con el esqueleto de quitosano mediante la interacción electrostática, lo que reduce el tamaño de la cadena de quitosano, mientras que sorbitol es un reticulador de las cadenas de quitosano de los enlaces de hidrógeno.



**Fig. 3.03.** Viscosidad dinámica de corte de quitosano 1% P/P (■), quitosano 1% P/P y sorbitol 5% P/P (●), quitosano 1% P/P y ácido gálico 1% P/P (□), y la mezcla con una composición de quitosano 1% P/P, sorbitol 5% P/P y ácido gálico 1% P/P (○) a 20 °C.

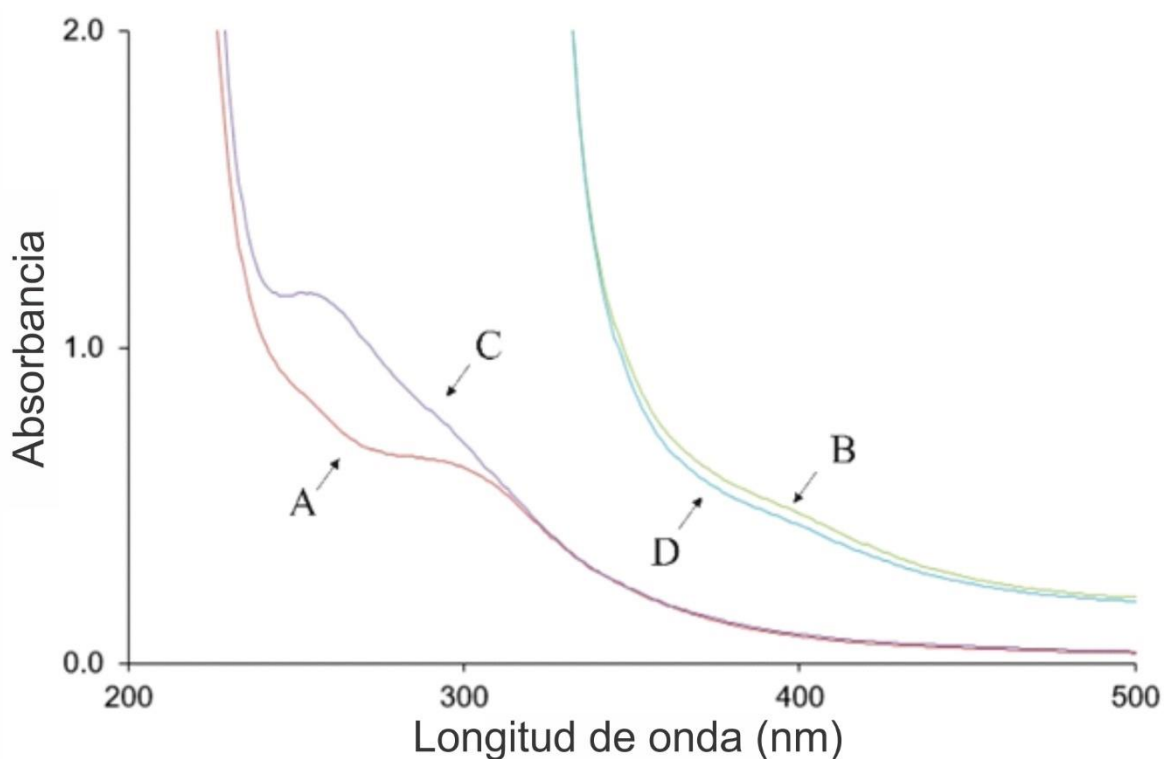
Además, las mezclas se caracterizaron por espectrometría UV-visible para evaluar de manera comparativa el perfil de sus curvas espectrales. En este sentido, la Figura 3.04 muestra las curvas espectrales UV-visibles de soluciones acuosas de quitosano puro y de quitosano mezclado, una de las cuales contiene también un 1% P/P de ácido gálico, otra con un 5% P/P de sorbitol, y una tercera con 1% P/P de ácido gálico y un 5% P/P de sorbitol.

Se encontró que la curva espectral para quitosano puro y para la mezcla de quitosano-sorbitol muestran un perfil similar, donde se puede observar una banda alrededor de 270 nm y un hombro cerca de 300 nm. Este comportamiento probablemente esté relacionado con el grupo carbonilo del N-acetilo de quitosano.

Por otro lado, la mezcla de quitosano-ácido gálico y quitosano-sorbitol-ácido gálico muestra curvas espectrales con perfiles similares, donde se encuentra una sobresaturación de la absorción en el rango de 200-350 nm. Este comportamiento se atribuye a la transición de electrones  $\pi$  de doble enlace del carbonilo del compuesto aromático con sustituyentes OH.



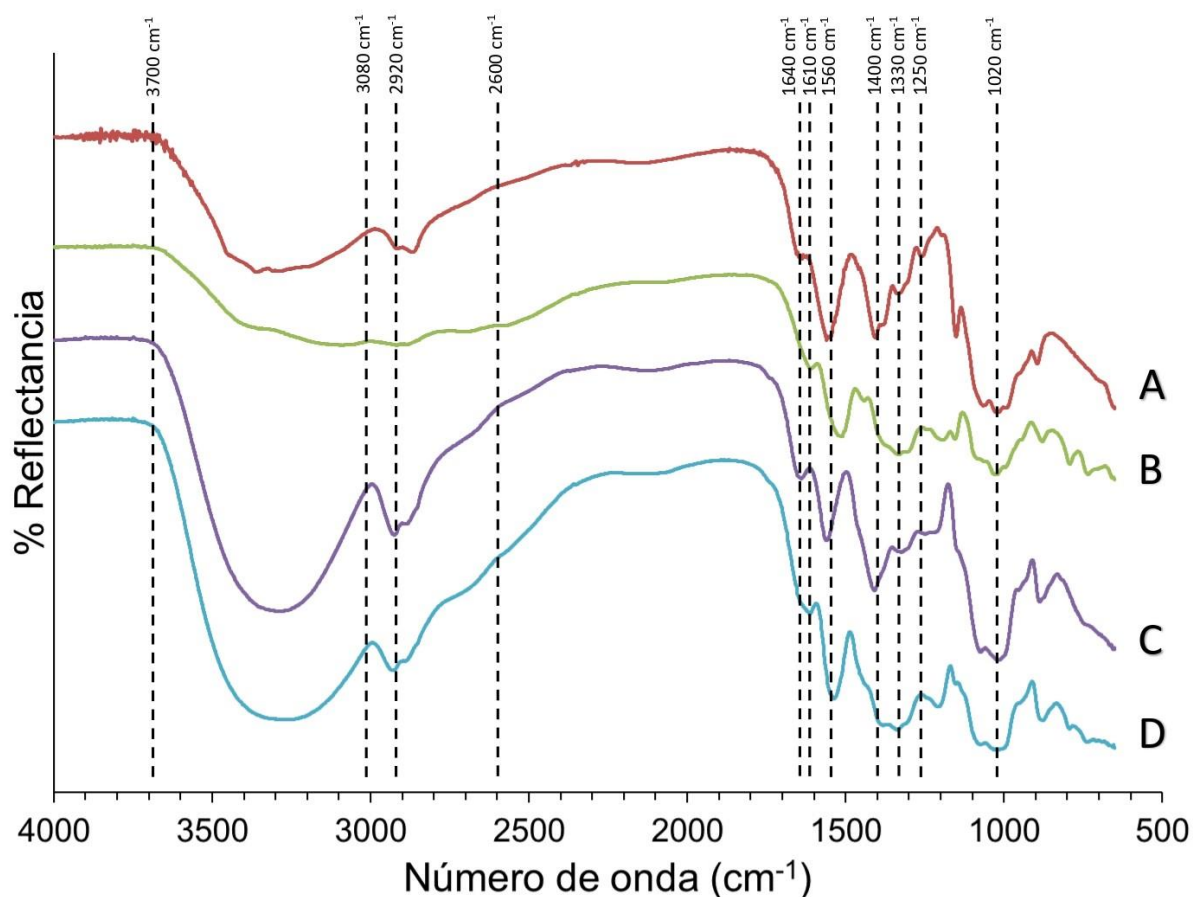
Este fenómeno apoya la presencia de ácido gálico en la mezcla, que es una sustancia con un alto coeficiente de absorción molar en ese rango de longitud de onda.



**Fig. 3.04.** Curvas espectrales UV-visibles para una solución acuosa de 1% en peso de quitosano (A) y su mezcla con 1% en peso de ácido gálico (B); con 5% en peso de sorbitol (C), y con 1% en peso de ácido gálico y 5% en peso de sorbitol (D).

Además, se utilizó la espectrometría FTIR para confirmar la potencial modificación de las cadenas de quitosano por su interacción con ácido gálico y sorbitol. La Figura 3.05 muestra los espectros FTIR de las películas obtenidas a partir de quitosano puro y sus mezclas con 1% P/P de ácido gálico; 5% P/P de sorbitol o 5% P/P de sorbitol-1% P/P de ácido gálico. La banda ancha entre  $3700$  y  $2600\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento O-H de los grupos carboxilos presentes en ácido gálico. Además, sorbitol y quitosano tienen una fuerte señal ( $3700\text{-}3080\text{ cm}^{-1}$ ) debida a la presencia del grupo hidroxilo, que se superpone al estiramiento N-H del polisacárido. Esta banda de estiramiento de OH se acentúa más en los espectros quitosano-sorbitol y quitosano-gálico-sorbitol debido a la presencia de sorbitol en esas mezclas. La señal a  $2920\text{ cm}^{-1}$  está asociada con el estiramiento de  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ , que se puede observar para sorbitol y quitosano. La banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de estiramiento C=O del grupo amida, que se

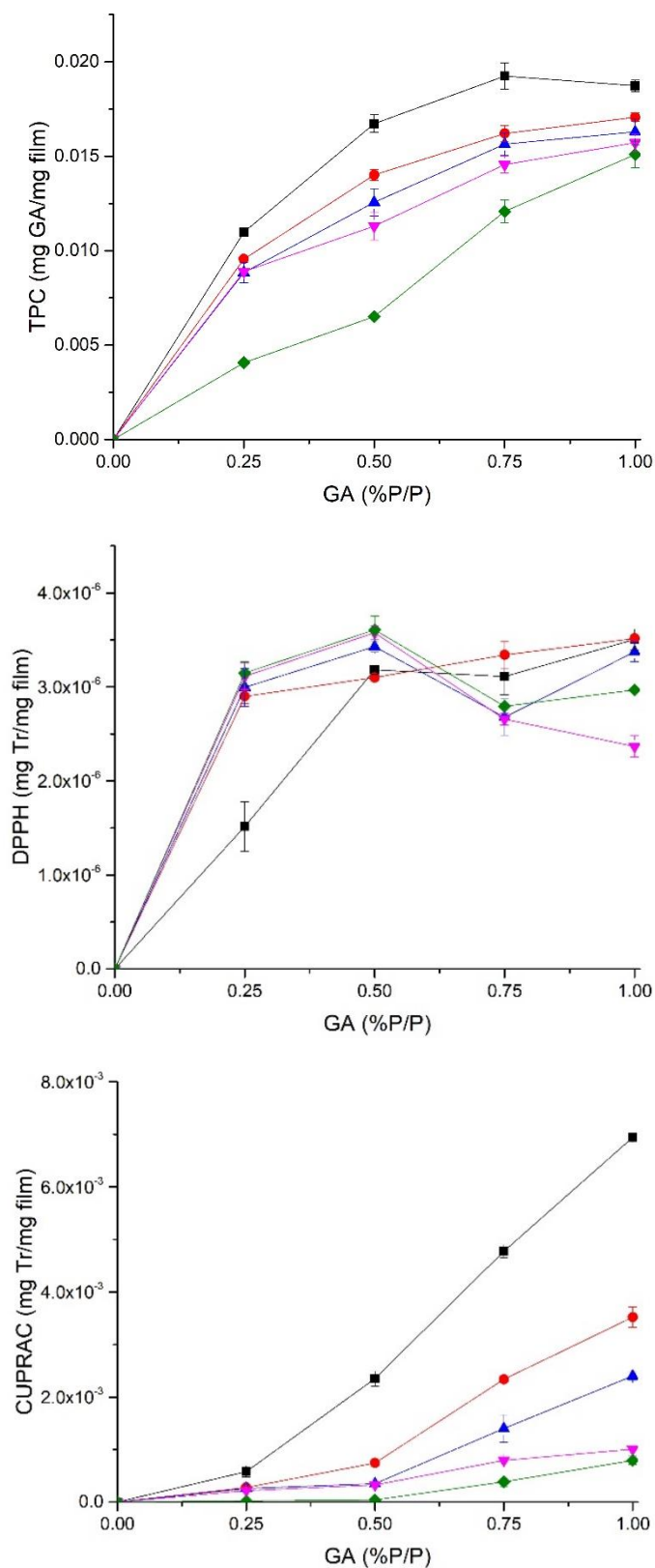
pudo observar para quitosano y su mezcla con sorbitol (Figura 3.05). La señal a  $1610\text{ cm}^{-1}$  cuando ácido gálico se incorpora a la composición final del producto, se asigna al estiramiento C=C correspondiente al anillo aromático de ácido gálico, que se superpone casi por completo a la banda de la amida a  $1640\text{ cm}^{-1}$ . Además, quitosano tiene una banda característica de  $1560\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la flexión N-H y la vibración de estiramiento C-N a  $1330\text{ cm}^{-1}$ . El estiramiento de C-O-C como un pico fuerte a  $1020\text{ cm}^{-1}$  aparecen en todas las mezclas debido a la presencia de quitosano. Finalmente, sorbitol muestra una banda ancha característica en el rango de  $1400\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ , que está asociada a la vibración combinada de tensión y flexión C-O-H.



**Fig. 3.05.** Espectros FTIR de películas basadas en quitosano. Quitosano (A), quitosano y su mezcla con 1% P/P de ácido gálico (B); quitosano y 5% P/P de sorbitol (C), y mezcla de quitosano, 5% P/P de sorbitol y 1% P/P de ácido gálico (D).

La Figura 3.05 también muestra que en el perfil de la curva D se pueden observar claramente las bandas de estiramiento O-H (próxima a  $3300\text{ cm}^{-1}$ ) y la vibración  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  ( $2920$  y  $2860\text{ cm}^{-1}$ ).

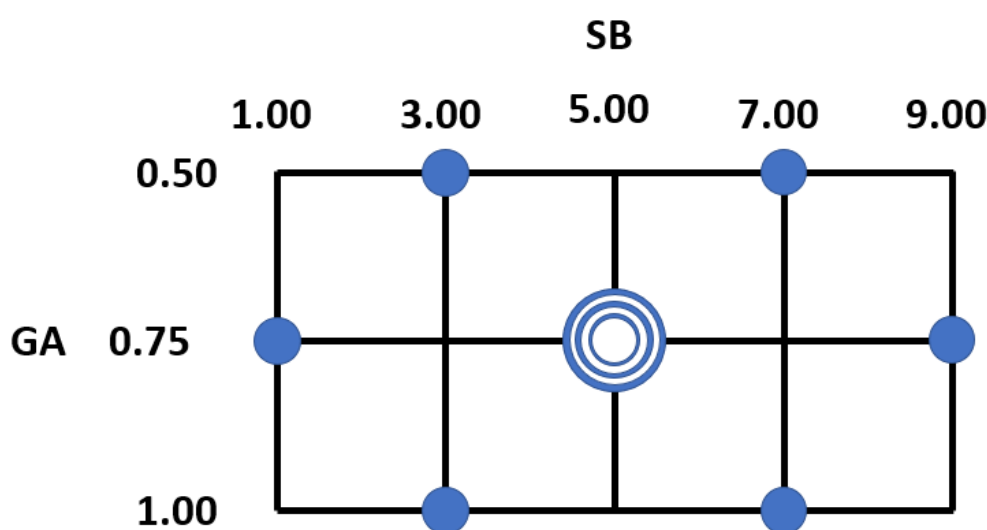
<sup>1</sup>), lo cual sugiere que la asociación de los grupos carboxilos entre sí ha disminuido. Este fenómeno sugiere que sorbitol interactúa mediante el enlace de puente hidrógeno con los grupos carboxilo de ácido gálico. Además, teniendo en cuenta que el tamaño de sorbitol es más pequeño que los otros componentes de la mezcla, la molécula de sorbitol se puede distribuir homogéneamente con mayor facilidad en el líquido e interactuar mediante puente de hidrógeno con esqueletos de quitosano y ácido gálico. Por lo tanto, se espera que sorbitol desempeñe un papel relevante como agente de reticulación y como plastificante a partir de estas interacciones no covalentes durante la formación de películas de quitosano por casting. En lo que respecta a la actividad antioxidante de las películas, la Figura 3.06 muestra la influencia de la concentración de sorbitol y ácido gálico sobre la capacidad antioxidante de las películas, visto a partir de tres gráficas: una que representa al ensayo TPC, otra al DPPH y la última al CUPRAC, y en donde el eje de las abscisas siempre corresponde al contenido de ácido gálico en la mezcla de reacción. En el caso del ensayo de TPC, los parámetros de actividad antioxidante aumentan con el contenido de ácido gálico en la película. Sin embargo, se observa que la actividad antioxidante de las películas disminuye cuando se utiliza una mayor concentración de sorbitol durante su formación. Este comportamiento está relacionado con el hecho de que sorbitol aumenta la masa final de las películas y diluye la concentración de ácido gálico. Además, no se debe descartar la disminución en la difusión de reactivos causada por el entrecruzamiento no covalente de las cadenas de quitosano reticulado, que aumenta cuando se utiliza un mayor contenido de sorbitol en la mezcla. Cabe señalar que no se encuentra actividad antioxidante en las películas sin ácido gálico, lo cual descarta alguna posible actividad de alguno de los otros componentes bajo esas condiciones de ensayo. La Figura 3.06 muestra que la mejor actividad antioxidante corresponde a aquellas películas con un contenido de ácido gálico superior a un 0,5% P/P, ya que, a partir de ese valor, y según se puede observar en los ensayos del DPPH y CUPRAC, los valores presentan variaciones mínimas.



**Fig. 3.06.** Influencia de la concentración de ácido gálico y sorbitol en los valores de TPC (A), DPPH (B) y CUPRAC (C) en películas con 1% P/P de quitosano y 0 ( ■ ), 2,5 ( ● ), 5 ( ▲ ), 7,5 ( ▼ ) y 10 ( ◆ ) % P/P de sorbitol.

## DISEÑO DE EXPERIMENTO Y METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

El diseño experimental para el desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta de un modelo de dos factores de acuerdo con el modelo de Doehlert (1970). Este modelo matemático fue seleccionado para identificar la interacción entre las variables de respuesta estudiadas y las variables independientes. Los dos factores, es decir, las variables independientes utilizadas en la formulación de películas fueron la concentración de sorbitol y ácido gálico, donde el rango de estas variables se basó en estudios previos de propiedades antioxidantes y solubilidades. La concentración de sorbitol se definió como un factor con cinco niveles ( $X_1$ : 1, 3, 5, 7, 9 % P/P), ya que según trabajos anteriores, la ausencia de plastificantes generaban un efecto negativo en las propiedades finales de las películas (Fakhoury *et al.*, 2012; Z. H. Zhang, Han, Zeng, Xiong, & Liu, 2015). Por otro lado, la composición de ácido gálico es un factor cuyos tres niveles ( $X_2$ : 0.50, 0.75, 1% P/P) representan la mejor actividad antioxidante según los ensayos preliminares. Un esquema del diseño de experimento puede verse en la Figura 3.07.



**Fig. 3.07.** Diseño de experimento según Doehlert aplicado a la preparación de películas de quitosano con ácido gálico y sorbitol, donde los puntos representan las películas preparadas.

Las variables de respuesta seleccionadas fueron: TPC ( $Y_1$ ), DPPH ( $Y_2$ ), CUPRAC ( $Y_3$ ), TS ( $Y_4$ ), EB ( $Y_5$ ), E ( $Y_6$ ), O ( $Y_7$ ), WVT ( $Y_8$ ) y P ( $Y_9$ ). Las variables de respuesta se evaluaron después de realizar 9 ensayos, donde seis de ellas fueron las películas obtenidas de diferentes formulaciones de

mezcla. Las pruebas restantes corresponden al punto central según el modelo de Doehlert para dos factores.

Se ajustaron polinomios cuadráticos para expresar cada variable de respuesta definida en este estudio en función de las variables independientes. En la ecuación 3.01,  $Y_n$  es la variable de respuesta donde  $b_0$  es un término constante;  $b_1$  y  $b_2$  son los coeficientes de los parámetros lineales como las composiciones de sorbitol ( $X_1$ ) y ácido gálico ( $X_2$ ), respectivamente. Además,  $b_{11}$  y  $b_{22}$  corresponden a los coeficientes del parámetro cuadrático, mientras que  $b_{12}$  es el coeficiente de los parámetros de interacción.

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (3.01)$$

Los coeficientes utilizados para los modelos de regresión de cada variable de respuesta estudiada y el análisis estadístico se realizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (v16.1, EE. UU.). La superficie de respuesta se estimó a partir de datos experimentales con un intervalo de confianza del 95%. Con el fin de obtener películas con una buena resistencia mecánica y las mejores propiedades antioxidantes, se optimizó la superficie de respuesta. Después de eso, se prepararon películas basadas en quitosano utilizando las condiciones óptimas predichas por las superficies de respuesta, y los datos experimentales se compararon con los valores teóricos, lo que permitió validar el rendimiento del modelo.

Los resultados se expresaron como la media de tres repeticiones. Los datos se analizaron mediante ANOVA y los resultados se compararon mediante la prueba de Fisher a un nivel de significancia de 0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico INFOSTAT.

## SUPERFICIES DE RESPUESTA

La disposición del diseño para las composiciones de las mezclas y los resultados experimentales de las variables dependientes en las diferentes películas se presentan en la Tabla 3.02. La ecuación 3.01 se utilizó para ajustar la superficie de respuesta de los datos experimentales para cada muestra investigada, como se muestra en la Tabla 3.03.

**Tabla 3.02.** Valores promedios experimentales de las respuestas obtenidas en el diseño experimental.

Run	Variables		Respuestas								
	$X_1$	$X_2$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$	$Y_5$	$Y_6$	$Y_7$	$Y_8$	$Y_9$
	<b>SB</b> % p/p	<b>GA</b> % p/p	<b>TPC</b> $\frac{mg\ GA}{mg\ film}$	<b>TEAC<sub>DPPH</sub></b> $\frac{mmol\ trolox}{mg\ film}$	<b>TEAC<sub>CUPRAC</sub></b> $\frac{mmol\ trolox}{mg\ film}$	<b>TS</b> MPa	<b>EB</b>	<b>E</b> MPa	<b>O</b> $\frac{UA}{mm}$	<b>WVT</b> $\frac{g}{m^2h}$	<b>P</b> $\frac{g \cdot mm}{mm\ Hg \cdot m^2 \cdot h}$
1	5	0,75	$3,3 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3}b$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 2, \times 10^{-7}a$	$2,4 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-4}a$	$1,9 \pm 0,3a$	$0,26 \pm 0,1b$	$15,8 \pm 0,9a$	$0,56 \pm 0,1a$	$59 \pm 4b$	$0,34 \pm 0,03b$
2	5	0,75	$3,3 \times 10^{-2} \pm 8 \times 10^{-4}b$	$4,7 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}a$	$2,3 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-5}a$	$2,7 \pm 0,5a$	$0,43 \pm 0,1b$	$14,4 \pm 0,9a$	$0,62 \pm 0,2a$	$55 \pm 3b$	$0,38 \pm 0,09b$
3	5	0,75	$3,3 \times 10^{-2} \pm 6 \times 10^{-4}b$	$4,7 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}a$	$2,5 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}a$	$1,9 \pm 0,7a$	$0,32 \pm 0,1b$	$13,0 \pm 3,3a$	$1,13 \pm 0,3a$	$54 \pm 4b$	$0,39 \pm 0,05b$
4	1	0,75	$3,7 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}b$	$4,4 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-7}a$	$5 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-4}b$	$8,5 \pm 1,4c$	$0,03 \pm 0,0a$	$614 \pm 141b$	$3,24 \pm 1,4b$	$63 \pm 15b$	$0,24 \pm 0,04a$
5	9	0,75	$3,0 \times 10^{-2} \pm 7 \times 10^{-4}b$	$5,8 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}b$	$1,4 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}a$	$0,9 \pm 0,3a$	$0,44 \pm 0,1b$	$1,7 \pm 0,2a$	$0,65 \pm 0,1a$	$57 \pm 9b$	$0,62 \pm 0,10c$
6	3	1	$4,4 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}b$	$4,7 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}a$	$5,7 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}b$	$4,1 \pm 1,9b$	$0,23 \pm 0,2b$	$98,2 \pm 6,4a$	$0,88 \pm 0,3a$	$53 \pm 6b$	$0,37 \pm 0,04b$
7	3	0,5	$2,2 \times 10^{-2} \pm 7 \times 10^{-3}a$	$5,6 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-7}b$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4}a$	$4,5 \pm 0,8b$	$0,40 \pm 0,1b$	$27,2 \pm 8,3a$	$1,69 \pm 0,1a$	$57 \pm 5b$	$0,32 \pm 0,01b$
8	7	1	$2,3 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-2}a$	$5 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-7}a$	$2,6 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}a$	$1,8 \pm 0,1a$	$0,54 \pm 0,1b$	$4,1 \pm 0,4a$	$0,58 \pm 0,2a$	$46 \pm 5b$	$0,49 \pm 0,09b$
9	7	0,5	$2,2 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}a$	$5,8 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-7}b$	$8,1 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-4}a$	$1,0 \pm 0,1a$	$0,35 \pm 0,1b$	$2,8 \pm 0,4a$	$0,98 \pm 0,4a$	$37 \pm 7b$	$0,39 \pm 0,06b$

Valores seguidos por la misma letra dentro de una misma columna implican diferencias no significativas ( $p < 0,05$ ). SB: sorbitol – GA: ácido gálico – TPC: polifenoles totales – TEAC<sub>DPPH</sub>: capacidad antioxidante DPPH – TEAC<sub>CUPRAC</sub>: capacidad antioxidante CUPRAC – TS: resistencia a la tracción – EB: elongación a la rotura – E: módulo de Young – O: opacidad – WVT: tasa de transferencia al vapor de agua – P: permeabilidad.

**Tabla 3.03.** Ecuaciones polinomiales y coeficiente de determinación para las respuestas de las variables investigadas respecto a las variables independientes utilizadas en la formulación de películas.

Ecuación polinómica de 2 <sup>do</sup> grado	R <sup>2</sup>
$Y_1 = -6,6497 \times 10^{-2} + 6,2753 \times 10^{-3} X_1 + 0,2107 X_2 + 1,5732 \times 10^{-5} X_1^2 - 1,0466 \times 10^{-2} X_1 X_2 - 9,0217 \times 10^{-2} X_2^2$	0,95
$Y_2 = 1,1250 \times 10^{-5} - 2,5638 \times 10^{-7} X_1 - 1,5362 \times 10^{-5} X_2 + 3,6146 \times 10^{-8} X_1^2 + 3,6 \times 10^{-8} X_1 X_2 + 8,996 \times 10^{-6} X_2^2$	0,91
$Y_3 = 2,3732 \times 10^{-3} - 6,0961 \times 10^{-5} X_1 + 1,0126 \times 10^{-2} X_2 + 4,9208 \times 10^{-5} X_1^2 - 1,1886 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 1,2556 \times 10^{-3} X_2^2$	0,99
$Y_4 = 12,7519 - 2,86792 X_1 - 3,755 X_2 + 0,158542 X_1^2 + 0,545 X_1 X_2 + 0,96 X_2^2$	0,98
$Y_5 = 123,156 - 2,64583 X_1 - 253,0 X_2 - 0,635417 X_1^2 + 18,0 X_1 X_2 + 110,0 X_2^2$	0,89
$Y_6 = 76,4047 - 213,425 X_1 + 1558,25 X_2 + 18,3568 X_1^2 - 34,835 X_1 X_2 - 874,58 X_2^2$	0,87
$Y_7 = 5,34135 - 1,15021 X_1 - 1,58 X_2 + 0,0734375 X_1^2 + 0,21 X_1 X_2 - 0,46 X_2^2$	0,90
$Y_8 = 9,86549 - 8,67522 X_1 + 188,235 X_2 + 0,222473 X_1^2 + 6,51585 X_1 X_2 - 144,555 X_2^2$	0,80
$Y_9 = 0,283219 - 0,0106232 X_1 - 0,0997015 X_2 + 0,00332764 X_1^2 + 0,0224055 X_1 X_2 + 0,089398 X_2^2$	0,92

Las variables de respuesta se ajustaron correctamente ya que para todas las respuestas se alcanzaron coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) superiores a 0,80. De esta manera, todas las variables de respuestas investigadas se incluyeron en el proceso de optimización. La naturaleza de la relación entre las variables independientes y las respuestas investigadas se representó mediante una superficie de respuesta tridimensional, que se generó a partir de la ecuación de regresión, como se puede ver en las Figuras 3.08 a 3.16.



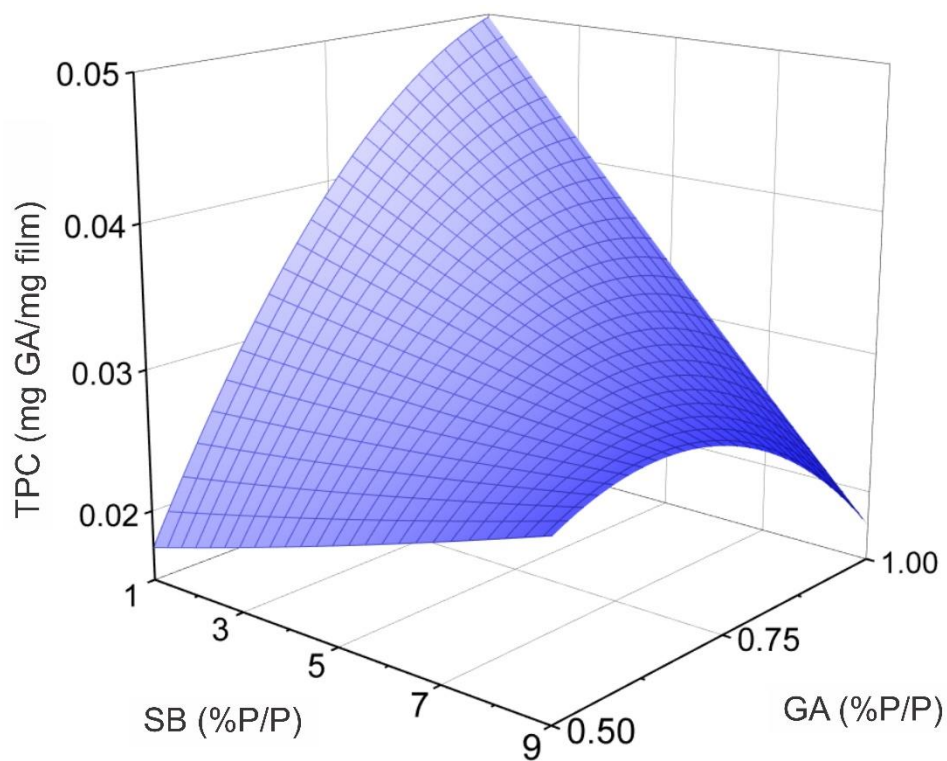


Fig. 3.08. Gráfico de superficie de respuesta de TPC.

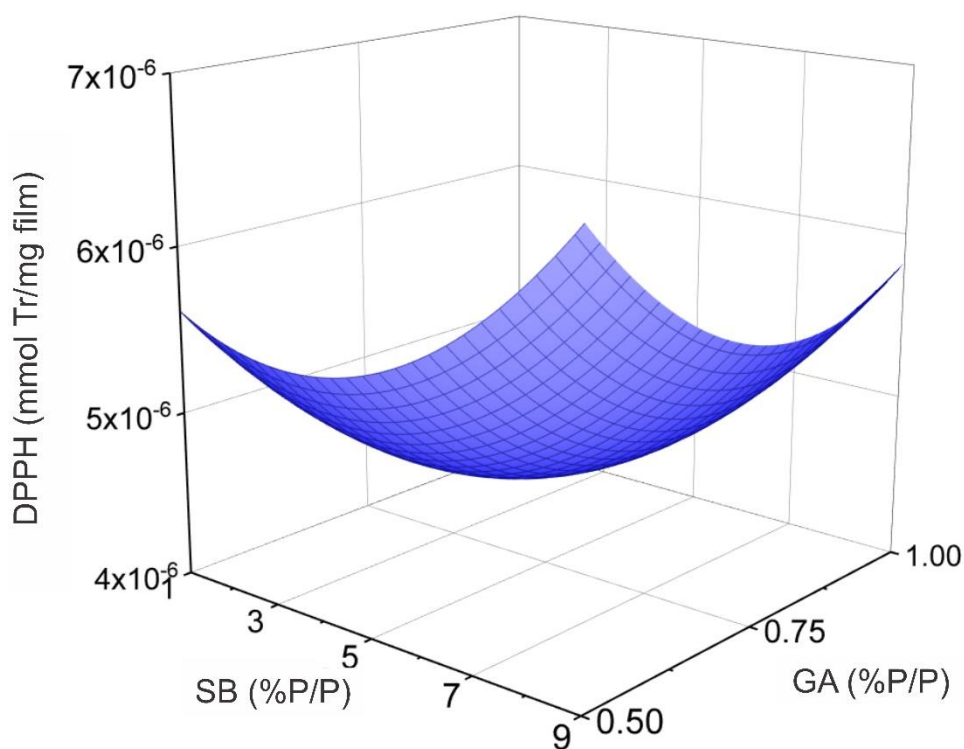
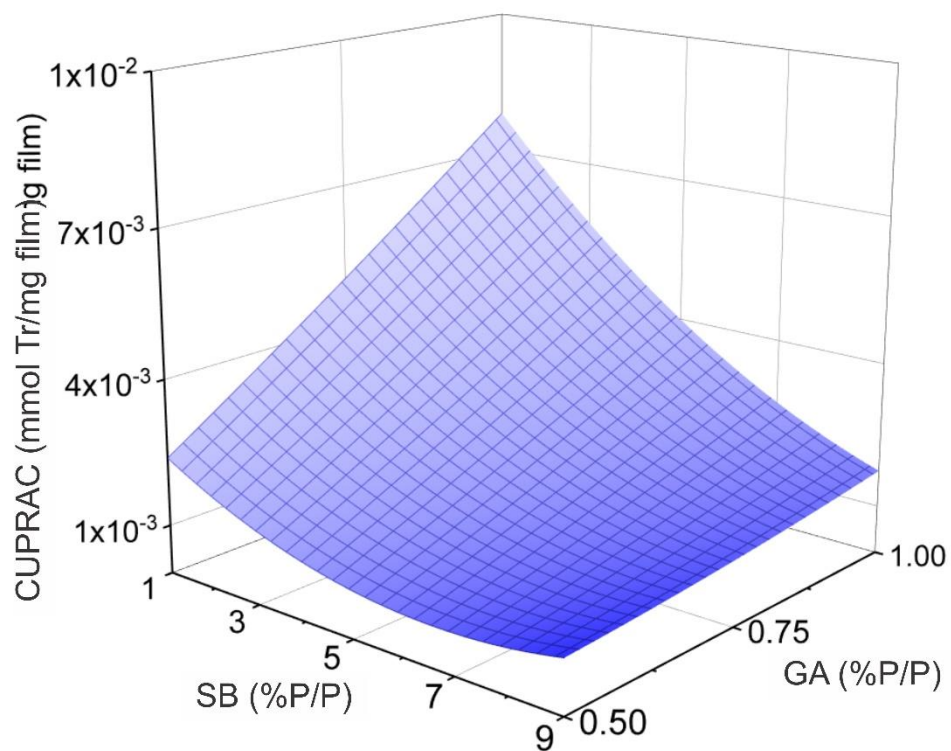
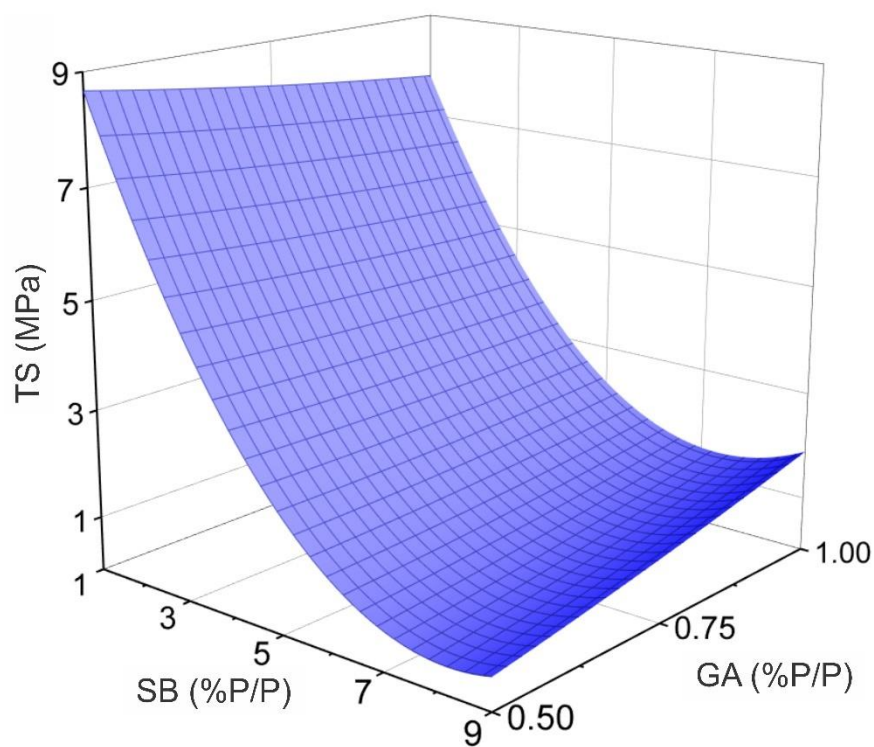


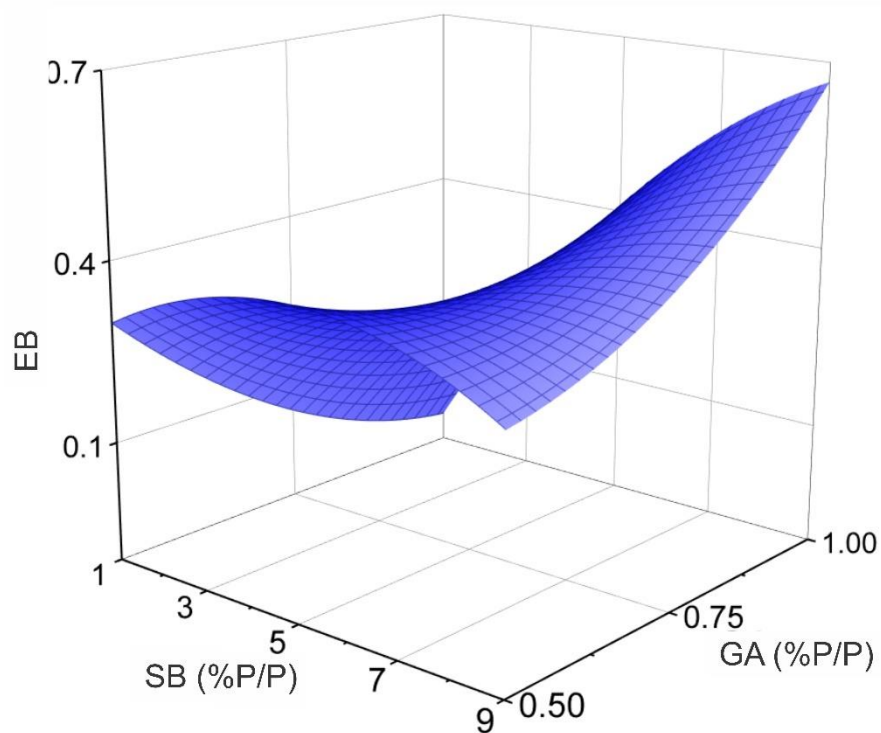
Fig. 3.09. Gráfico de superficie de respuesta de DPPH.



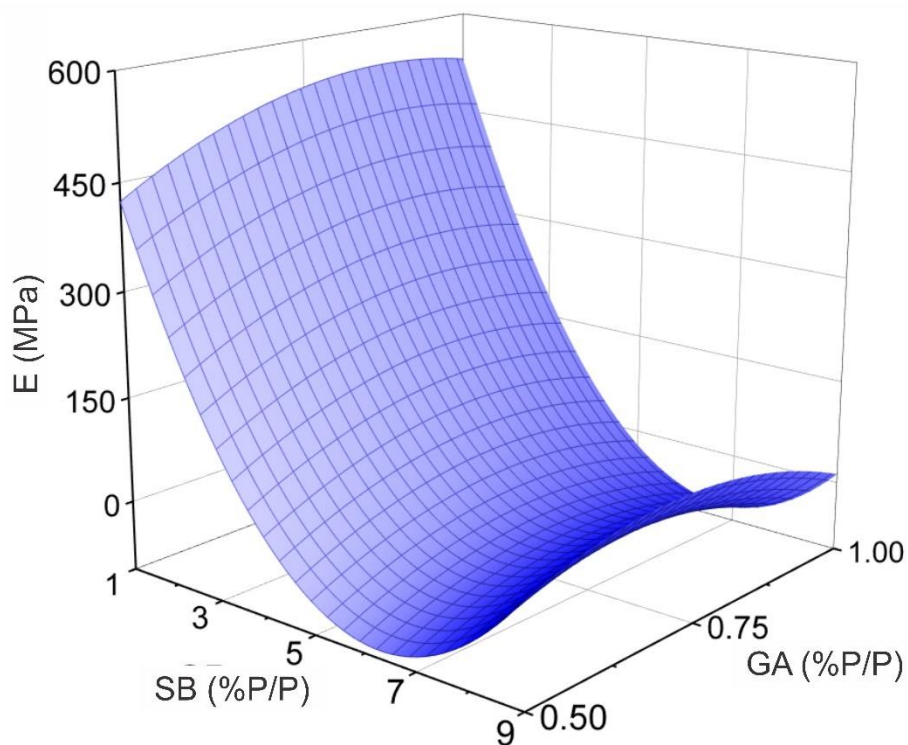
**Fig. 3.10.** Gráfico de superficie de respuesta de CUPRAC.



**Fig. 3.11.** Gráfico de superficie de respuesta de resistencia a la tracción.



**Fig. 3.12.** Gráfico de superficie de respuesta de elongación a la rotura.



**Fig. 3.13.** Gráfico de superficie de respuesta de módulo de Young.

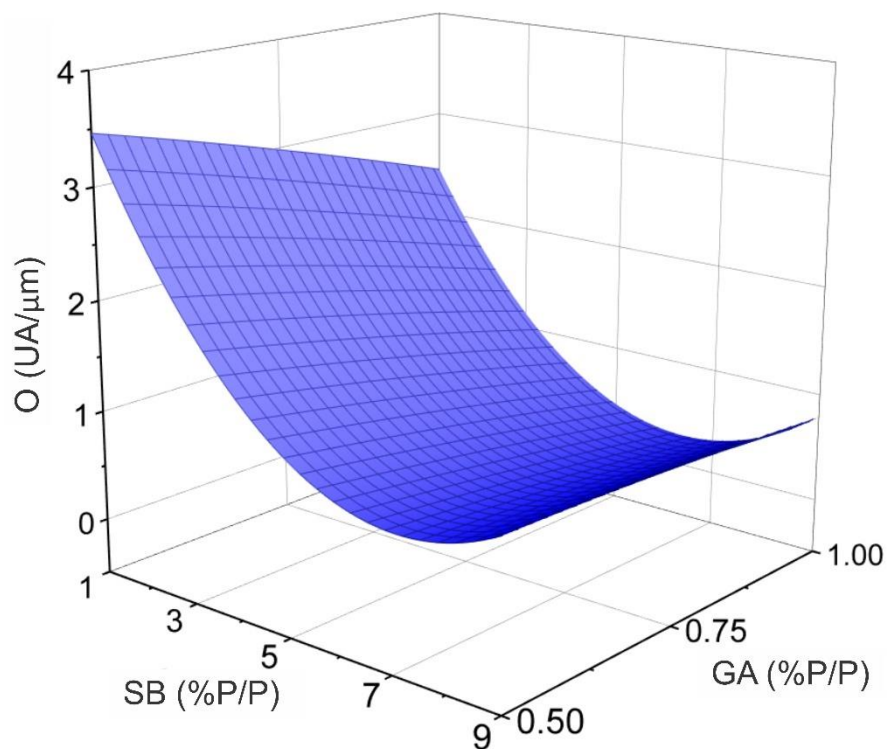


Fig. 3.14. Gráfico de superficie de respuesta de opacidad.

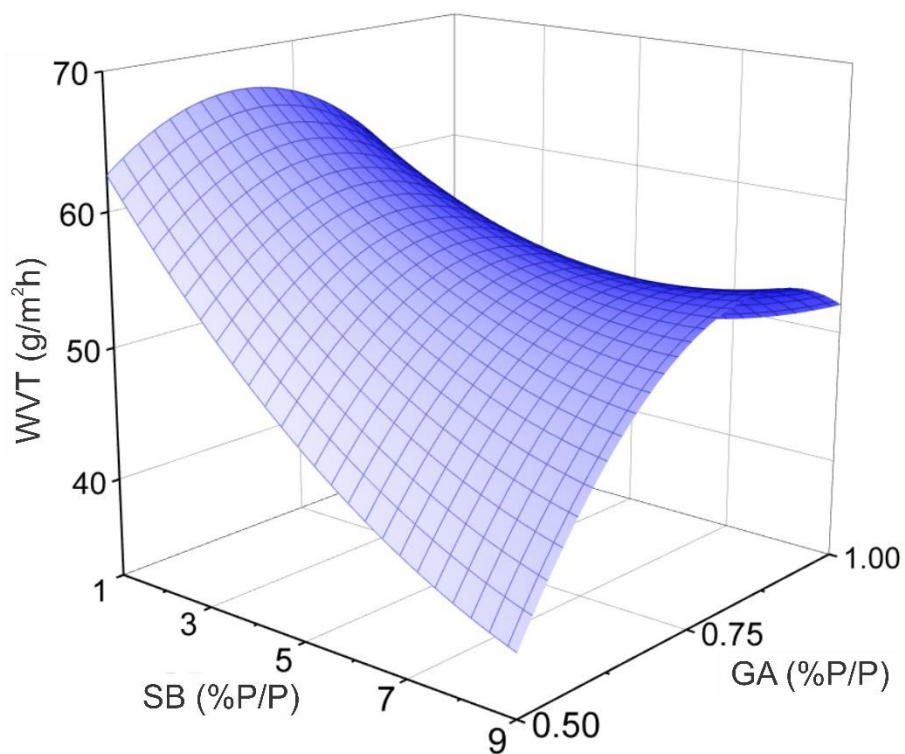
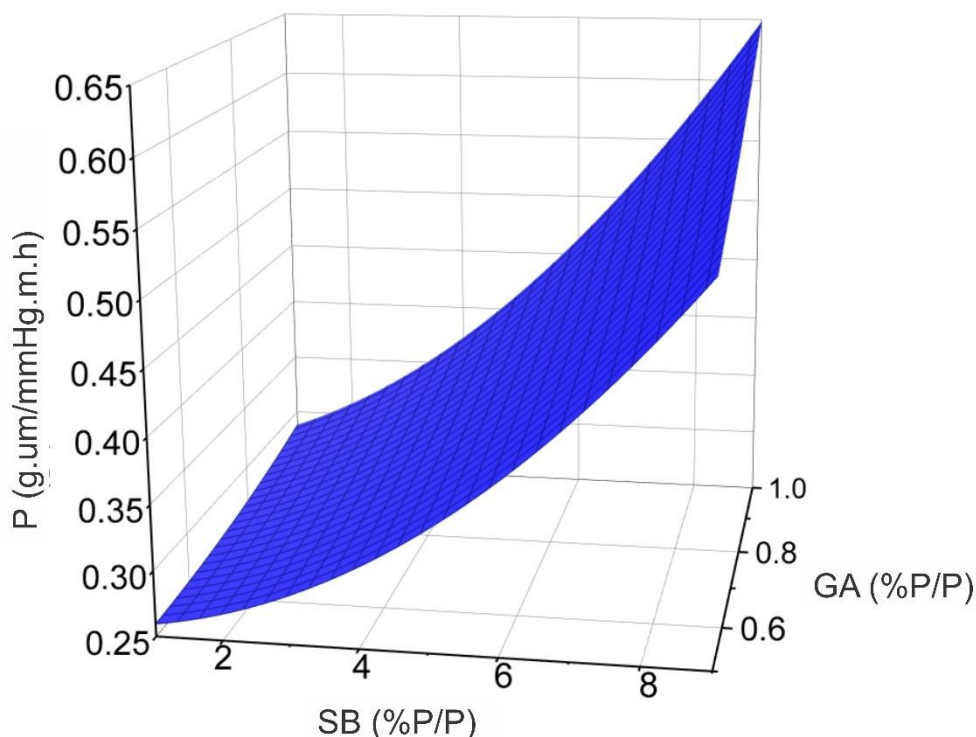


Fig. 3.15. Gráfico de superficie de respuesta de transmisión de vapor de agua WVT.



**Fig. 3.16.** Gráfico de superficie de respuesta de permeabilidad.

El efecto de la presencia de sorbitol y la concentración de ácido gálico fue significativo ( $p < 0.05$ ) en las respuestas de actividad antioxidante de TPC, DPPH y CUPRAC ( $Y_1, Y_2, Y_3$ ) en el primer efecto de orden lineal ( $X_1$  y  $X_2$ ) y el efecto combinado ( $X_1X_2$ ). Se encontró que el valor experimental de TPC oscila entre 0.0217 y 0.0437 mg de ácido gálico / mg de película,  $TEAC_{DPPH}$  varía entre  $4.26 \times 10^{-6}$  y  $5.8 \times 10^{-6}$  mmol de Trolox / mg de película, mientras que  $TEAC_{CUPRAC}$  cambia de 0.00081 a 0.0057 mmol Trolox / mg Película (Tabla 3.02).

Las Figuras 3.08, 3.09 y 3.10 muestran que las superficies de respuesta de TPC y CUPRAC tienen un comportamiento similar en el que ambos parámetros aumentan junto con el contenido de ácido gálico o se utiliza un menor contenido de sorbitol en la mezcla. Sin embargo, la superficie de respuesta para DPPH presenta un rendimiento diferente, mostrando un valor mínimo de 5% P/P de sorbitol y 0.75% P/P de ácido gálico. Por otro lado, esta superficie presenta su valor máximo de DPPH a la concentración más alta de sorbitol y un 0.5% P/P de contenido de ácido gálico.

Con respecto a las propiedades mecánicas de TS, EB y E ( $Y_4, Y_5, Y_6$ ), en general se encuentra que solo el primer efecto de orden lineal de sorbitol ( $X_1$ ) fue significativo ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento está de acuerdo con el hecho de que sorbitol funciona como un agente de

reticulación no covalente, que afecta directamente las propiedades mecánicas de las películas a partir de la formación de enlaces de puente hidrógeno. Dependiendo de la concentración de ácido gálico y sorbitol en las películas, las propiedades mecánicas muestran una gran variación (Tabla 3.02). Aquí, la resistencia a la tracción fluctúa de 0,90 a 8,46 MPa, el valor de EB varía de 0,03 a 0,54, y se encuentra que el Módulo de Young varía entre 1,73 y 614,29 MPa. La superficie de respuesta de TS (Figura 3.11) muestra que su valor aumenta cuando la concentración de sorbitol disminuye. Por otro lado, la superficie de respuesta del módulo E muestra un cambio marcado para una concentración de sorbitol superior a un 5% P/P. Bajo esta condición, un aumento del contenido de sorbitol y ácido gálico conduce a un aumento en el porcentaje de elongación de la película. Además, se observa que la superficie de respuesta del módulo de Young disminuye contra la concentración de sorbitol hasta alcanzar un valor cercano al 7% P/P. Después de eso, el Módulo de Young aumenta junto con la concentración de sorbitol. Este fenómeno puede explicarse por el predominio de las interacciones puente hidrógeno entre quitosano, sorbitol y ácido gálico. Cuando el contenido de sorbitol es bajo, predominan la interacción electrostática y puente hidrógeno entre las cadenas de quitosano y ácido gálico. Este último actúa como un agente de reticulación a través de enlaces no covalentes, lo que da un valor E más alto debido al hecho de que ácido gálico es una molécula rígida. Después de un 7% P/P de contenido de sorbitol, sus interacciones de puente hidrógeno con los otros reactivos aumentan y actúan como un agente de reticulación exitoso. De esta manera, el módulo E vuelve a crecer, pero con un valor más bajo debido al hecho de que sorbitol es una molécula más flexible que ácido gálico (Figura 3.13).

Además, se encontró que el contenido de sorbitol ( $X_1$ ) tiene un efecto significativo sobre la opacidad ( $p < 0,05$ ) de las películas obtenidas. El valor de opacidad varía en un rango de 0,56-3,24 UA/mm para estas películas, mientras que la tasa de transmisión de vapor de agua WVT lo hace entre 37,22 y 62,56 g/m<sup>2</sup>h, y la permeabilidad entre 0,24 y 0,62 g.mm/mmHg.m<sup>2</sup>.h (Tabla 3.02). La Figura 3.14 muestra que una mayor concentración de sorbitol en la mezcla conduce a una disminución de la opacidad de la película, ya que sorbitol provoca desordenes en las cadenas de quitosano, obteniendo así un mayor grado de regiones amorfas. El valor más alto WVT se alcanza con el contenido de sorbitol más bajo junto con un 0,75% P/P de la concentración de ácido gálico (Figura 3.15). Sin embargo, se pudo observar un alto valor de permeabilidad para las películas que contienen la mayor concentración de sorbitol, donde no se evidencia una dependencia del contenido de ácido gálico (Figura 3.16). Es importante

resaltar esto, porque si la intención de la película es usarla como empaque, WVT y P deben ser bajos.

## OPTIMIZACIÓN

Con el objeto de obtener películas con una buena resistencia mecánica y con capacidad antioxidante, se realizaron optimizaciones numéricas para determinar los valores óptimos para las variables independientes de acuerdo con las variables de respuesta deseadas.

Las mejores capacidades antioxidantes se obtuvieron para películas con el mayor valor de TPC, DPPH y CUPRAC. En este sentido, estas variables fueron maximizadas a partir del método de superficie de respuesta utilizado. Con respecto a las propiedades mecánicas, una película debe tener una buena resistencia a la tracción y una elasticidad aceptable cuando su uso se enfoca como embalaje. Por lo tanto, el valor de la resistencia a la tracción y la elongación a la rotura de estas películas se maximizó, mientras que el módulo de Young, que indica la elasticidad longitudinal del material, se minimizó. Además, teniendo en cuenta que este tipo de película debe tener un buen control de la transferencia de agua y una buena apariencia, el valor de la opacidad, la tasa de transmisión de vapor de agua y la permeabilidad se redujeron al mínimo. En resumen, las variables de respuesta de TPC, DPPH, CUPRAC, EB y TS ( $Y_1$  a  $Y_5$ ) fueron maximizadas, mientras que E, O, WVT y P ( $Y_6$  a  $Y_9$ ) fueron minimizadas.

Considerando estas suposiciones para el modelo matemático propuesto, una mezcla con un 3,62% P/P de sorbitol, un 1% P/P de contenido de ácido gálico y un 1% P/P de quitosano se encuentra que es la composición óptima para construir la película deseada. A partir de los datos predichos por el modelo, las películas se prepararon por triplicado en estas condiciones optimizadas. La Tabla 3.04 informa un análisis comparativo entre los valores predichos y experimentales con su desviación estándar correspondiente para cada variable de respuesta. Se encontró una buena concordancia entre los valores experimentales y predichos para TPC, DPPH, CUPRAC, EB, E, O y P. Las mayores diferencias entre el valor predicho y el valor experimental se encontraron para los parámetros TS y WVT, lo que estaría relacionado con su alta desviación estándar natural por la variabilidad de las condiciones de ejecución del experimento. No se descarta el hecho que las condiciones límite establecidas para estos parámetros en el desarrollo del modelo no fueron las más adecuadas, lo que magnifica los errores. Se destaca además que los valores determinados coinciden con los expresados por

otros autores (Butler, Vergano, Testin, Bunn, & Wiles, 1996; J. Liu *et al.*, 2017; M. Liu, Zhou, Zhang, Yu, & Cao, 2014).

El coeficiente de determinación del modelo completo es 0,98, el cual apoya el hecho de que el modelo propuesto exhibe un buen ajuste frente a los datos experimentales. Este modelo matemático permitió determinar las condiciones óptimas del sistema para obtener películas de quitosano con propiedades asignadas previamente. Estos resultados sugieren que el uso de estos modelos en el estudio de variables es prometedor, ya que mejoran significativamente la respuesta de la ingeniería química para resolver un desafío tecnológico en particular.

**Tabla 3.04.** Valores predichos y experimentales de respuestas

		Predicho	Experimental
$Y_1$	TPC (mg gallic acid/mg film)	$3,90 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-3}$
$Y_2$	DPPH (mg Trolox/mg film)	$4,56 \times 10^{-6}$	$4,3 \times 10^{-6} \pm 8 \times 10^{-7}$
$Y_3$	CUPRAC (mg Trolox/mg film)	$5,13 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-5}$
$Y_4$	TS (MPa)	3,63	$7,7 \pm 0,4$
$Y_5$	EB	0,27	$0,16 \pm 0,1$
$Y_6$	E (MPa)	102	$107 \pm 30$
$Y_7$	O (UA/mm)	0,859	$1,0 \pm 0,1$
$Y_8$	WVT (g/m <sup>2</sup> .h)	48,6	$67 \pm 6$
$Y_9$	P (g.mm/mmHg.m <sup>2</sup> .h)	0,359	$0,33 \pm 0,02$

SB: sorbitol – GA: ácido gálico – TPC: polifenoles totales – DPPH: capacidad antioxidante DPPH – CUPRAC: capacidad antioxidante CUPRAC – TS: resistencia a la tracción – EB: elongación a la rotura – E: módulo de Young – O: opacidad – WVT: tasa de transferencia al vapor de agua – P: permeabilidad.

## CONCLUSIONES

Los estudios preliminares en las propiedades antioxidantes permitieron determinar el rango de las variables independientes de sorbitol como plastificante y ácido gálico como antioxidante para la metodología de superficie de respuesta en un modelo Doehlert de dos factores.

Los valores experimentales de cada variable de respuesta investigada usando el modelo de Doehlert, se ajustaron con una ecuación de polinomios cuadráticos con un coeficiente de



regresión obtenido en el rango de 0,80-0,99. Para obtener una película mecánica resistente con las mejores propiedades físicas y antioxidantes, las variables de respuesta del modelo de TPC, DPPH, CUPRAC, EB y TS fueron maximizados, mientras que E, opacidad, WVT y permeabilidad fueron minimizados. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el programa identificó la mezcla con un 3,62% P/P de sorbitol y un 1% P/P de ácido gálico agregado a la solución de quitosano al 1% P/P como la composición óptima para formar una película con las características fisicoquímicas buscadas. Las variables de respuesta de la película sintetizada determinadas experimentalmente mostraron un acuerdo cercano con las predicciones del modelo, lo cual permitió validar la respuesta del modelo .



## CAPÍTULO 4: EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE REACCIÓN SOBRE LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

Como se observó en el capítulo anterior, el agregado de ácido gálico y sorbitol bajo determinadas condiciones, establecieron valores óptimos deseables de síntesis de películas a base de quitosano frente a diferentes respuestas. Además de la variación de la composición química del material constitutivo de la película, se pueden realizar tratamientos térmicos que mejoren su estabilidad.

El presente capítulo aborda el estudio de la optimización de las condiciones de síntesis para la preparación de películas de quitosano-ácido gálico-sorbitol, con el objeto de determinar beneficios y desventajas sobre sus propiedades mecánicas, antioxidantes y físicas.

### MATERIALES Y METODOS

#### PREPARACIÓN DE PELÍCULAS

Las películas sintetizadas para completar los objetivos planteados de este estudio fueron obtenidas a partir de la evaporación de agua (método “casting”) a temperatura ambiente de mezclas de reacción que contenían 1% p/p de ácido gálico como principio bioactivo, 3,62% p/p de sorbitol como plastificante y solución de quitosano al 1% p/p como matriz polimérica, como se obtuvo de la optimización del capítulo anterior.

En este estudio se evaluó el efecto del tiempo y la temperatura usado durante la formación de la mezcla de reacción. Para ello, las reacciones se llevaron a cabo en celdas encamisada conectadas a un baño termostático, y con agitación constante mediante la utilización de un agitador magnético, tal como lo ilustra la Figura 3.01. Una vez obtenidas las películas, las mismas fueron utilizadas sin ninguna purificación o lavado posterior.



**Fig. 4.01.** Celda encamisada conectada a baño termostático para modificación de condiciones de reacción.

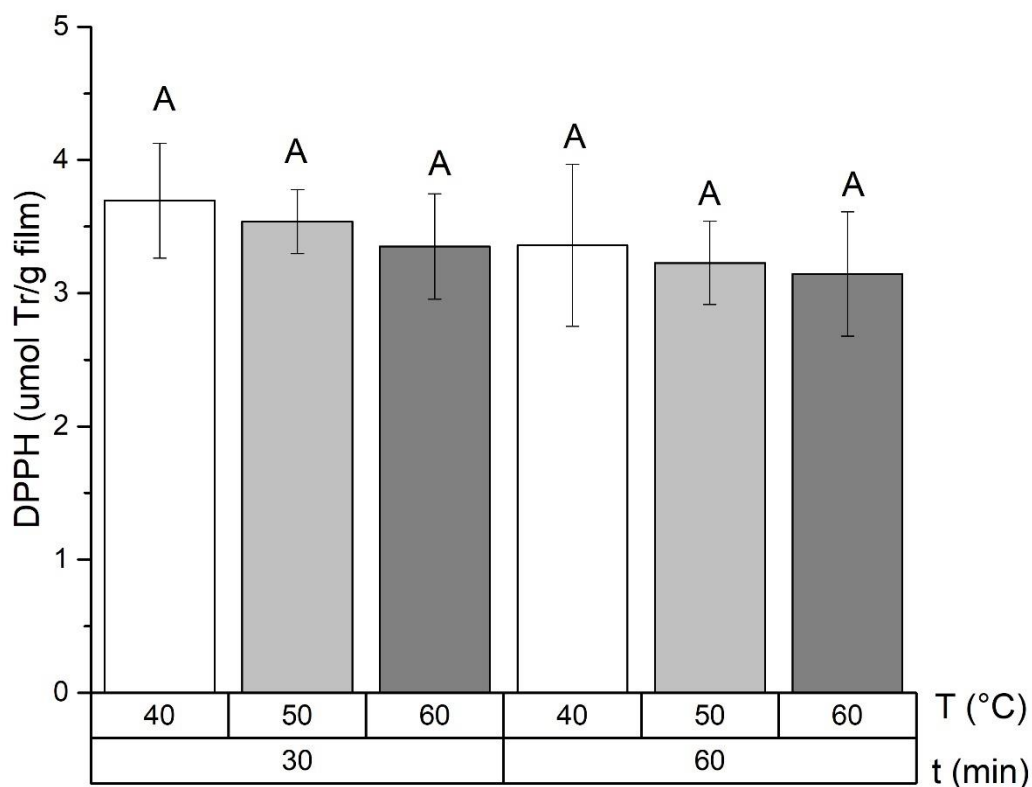
Previo a la generación de las superficies de respuestas para obtener una película con las condiciones óptimas, se llevó a cabo un exhaustivo trabajo preliminar en donde fueron analizadas 6 condiciones de reacción para la obtención de la película de quitosano al 1% P/P, con ácido gálico al 3,62% P/P y sorbitol al 1% P/P, las cuales se detallan en la Tabla 4.01:

**Tabla 4.01.** Condiciones de reacción propuesta para el desarrollo de la película óptima.

N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
REF	25	10
1	40	30
2	40	60
3	50	30
4	50	60
5	60	30
6	60	60

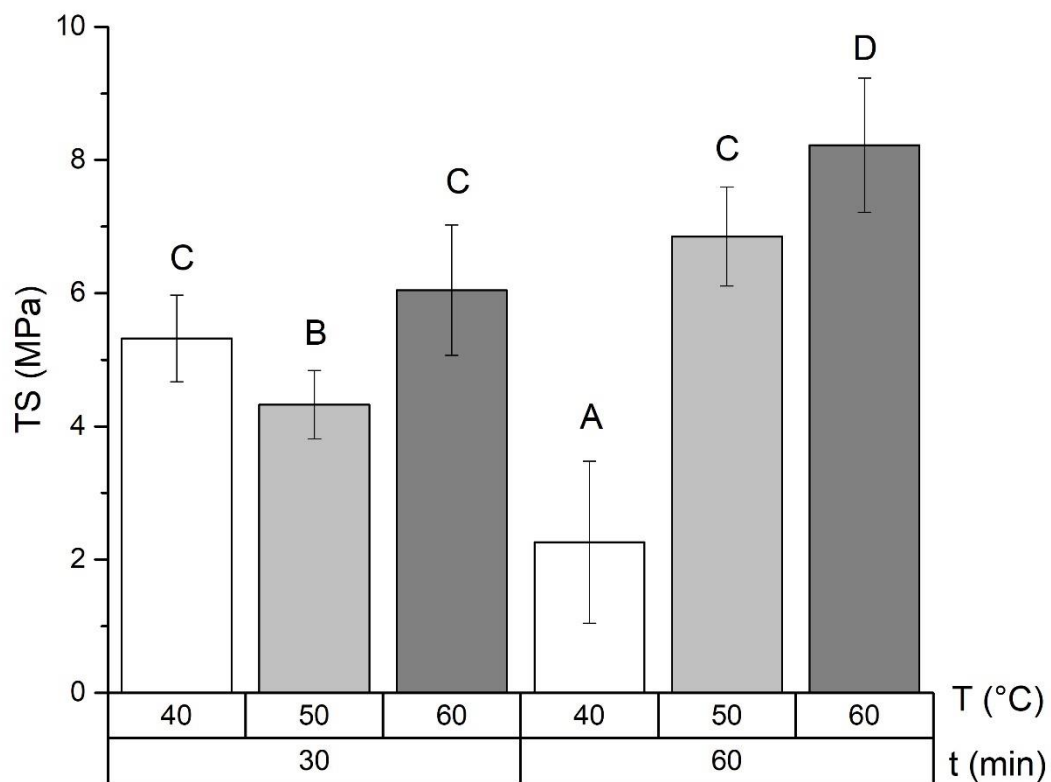
### ANÁLISIS EXPLORATORIO

La capacidad antioxidante de las películas fue determinada a través de la reacción del radical DPPH. La Figura 4.02 muestra el desempeño de DPPH de las películas de ácido gálico/sorbitol/quitosano obtenidas bajo el tratamiento térmico de la mezcla de reacción a diferentes tiempos y temperaturas, en donde las barras indican los desvíos positivos de las determinaciones. Se puede observar que un aumento tanto en las temperaturas como en los tiempos de reacción, generan una disminución en el valor de la capacidad antioxidante de las películas, lo cual sugiere que una mayor cantidad de ácido gálico ha sido unido covalentemente a la cadena de quitosano. Esta pérdida de libertad traslacional de ácido gálico produce una disminución en su capacidad antioxidante en las condiciones de estudio empleadas.



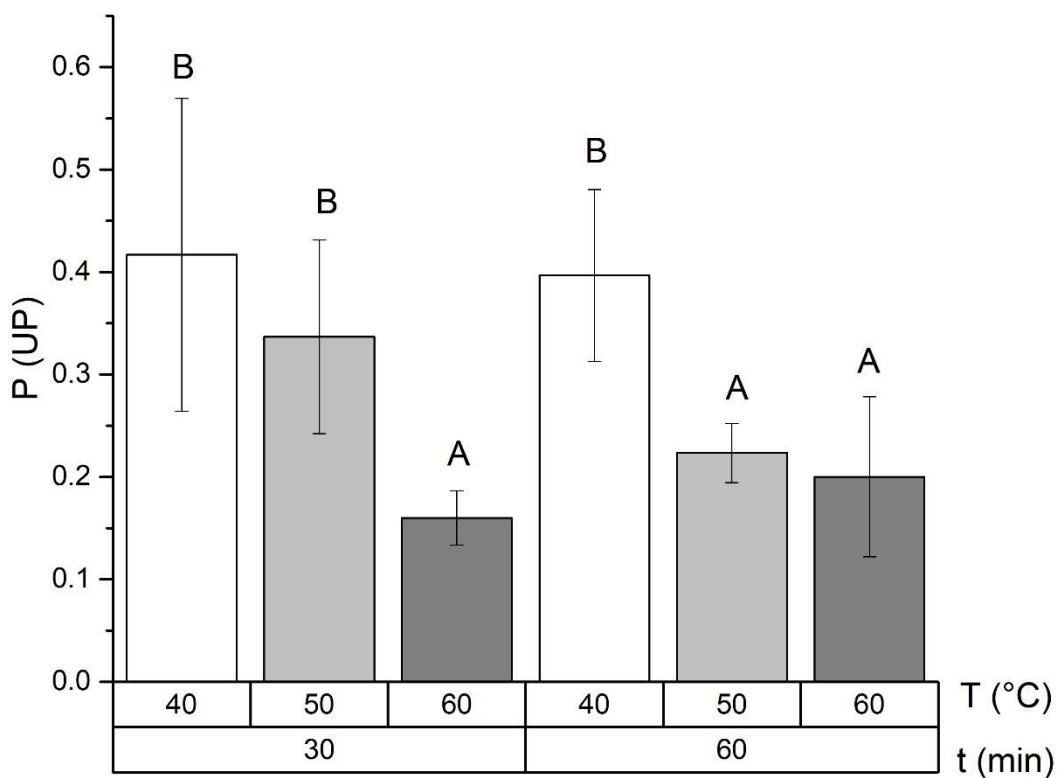
**Fig. 4.02.** Análisis de la actividad antioxidante a partir de la inhibición el radical DPPH, expresado como  $\mu\text{mol}$  de Trolox por g de película a diferentes temperaturas y tiempos.

Por su parte, a la hora de desarrollar un nuevo material, es pertinente evaluar su resistencia mecánica, teniendo en cuenta su función protectora como lo es, por ejemplo, en el caso de almacenamiento de alimentos. La Figura 4.03 muestra los valores obtenidos para la resistencia a la tracción correspondientes a las películas sintetizadas en diferentes condiciones de síntesis. Los valores de la resistencia a la tracción de estos materiales variaron entre 2,26 y 8,22 MPa. Se puede observar que este parámetro para temperaturas entre 50 y 60°C incrementa con el aumento del tiempo de reacción. Sin embargo, a 40°C el efecto del tiempo de reacción es opuesto, donde se genera una película con una menor resistencia a la tracción, lo cual puede deberse a una mayor homogenización del plastificante.



**Fig. 4.03.** Resistencia a la tracción de películas a base de quitosano, ácido gálico y sorbitol a diferentes temperaturas y tiempos.

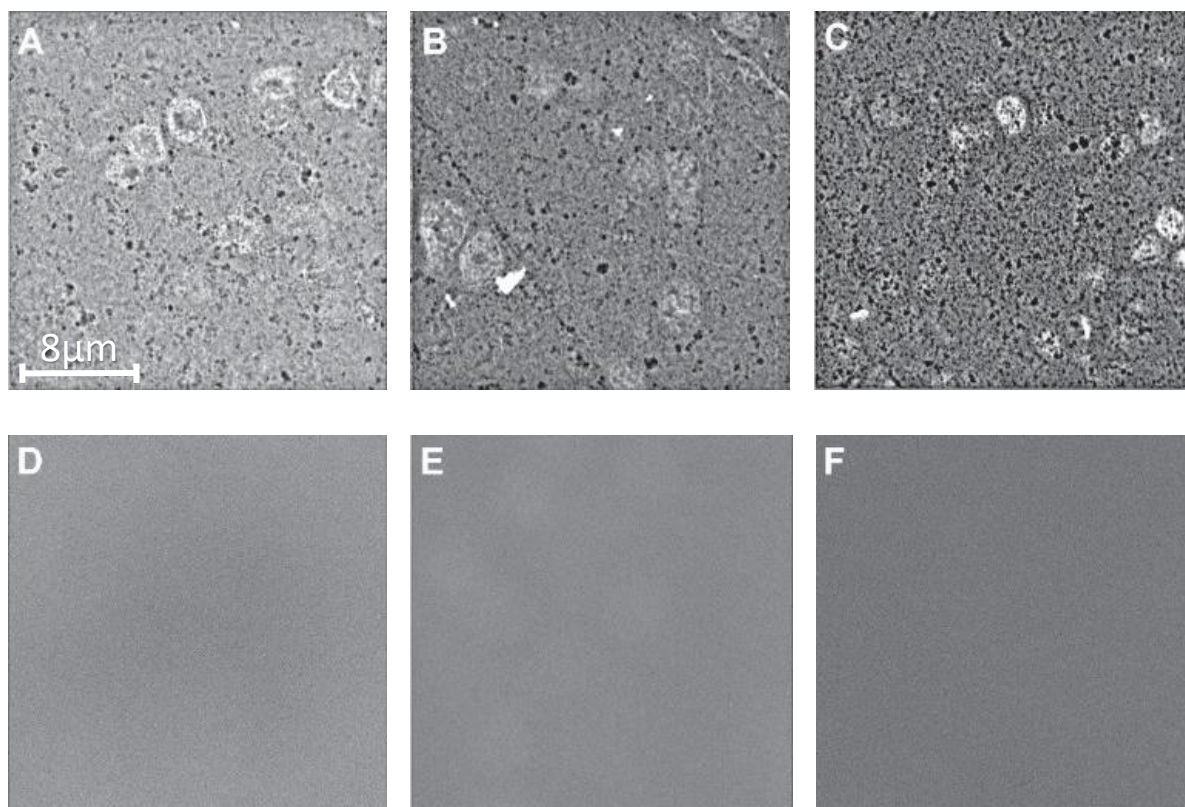
En lo que respecta a la evaluación de la permeabilidad de las películas sintetizadas, los valores variaron entre 0,16 y 0,41 unidades de permeabilidad (UP), como muestra en la Figura 4.04.



**Fig. 4.04.** Permeabilidad de películas a base de quitosano, ácido gálico y sorbitol.

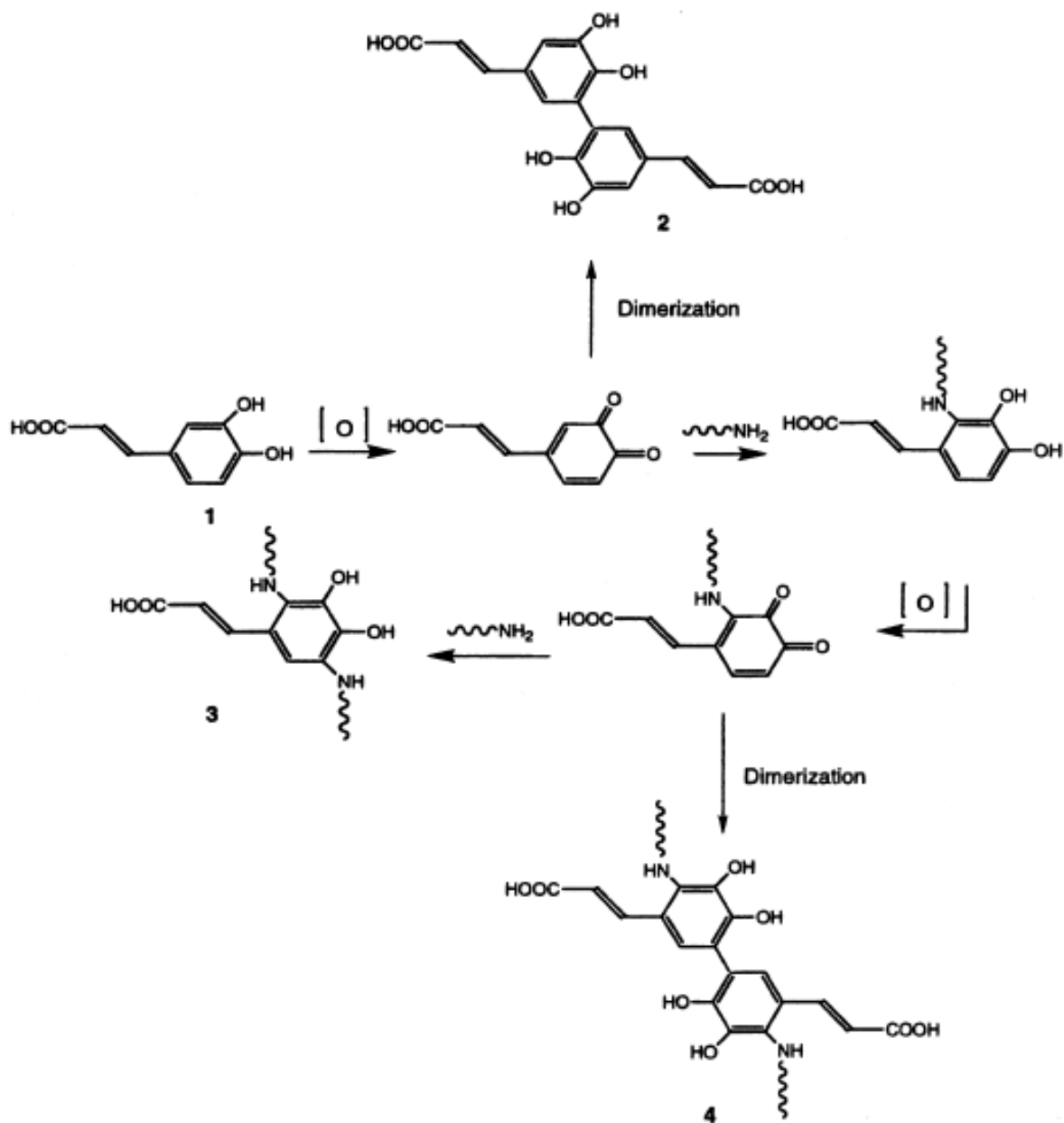
En términos generales, se puede considerar que a mayor temperatura y tiempo de reacción se generan películas con un valor de permeabilidad menor debido al mayor grado de entrecruzamiento de cadenas alcanzado. Sin embargo, se debe destacar que a 40°C las películas formadas muestran la mayor permeabilidad, donde no se observa de manera clara la influencia del tiempo de reacción. Por su parte, aquellas películas obtenidas a 50 y 60°C con un tiempo de tratamiento térmico mayor muestran un comportamiento similar con la más baja permeabilidad, lo cual sugiere que bajo estas condiciones de síntesis se alcanza el más alto grado de entrecruzamiento de cadenas de quitosano por parte de ácido gálico.





**Fig. 4.05.** Imágenes obtenidas por SEM (10000X) de las superficies de películas a base de quitosano-ácido gálico y sorbitol. A: 40°C – 30min, B:40°C – 60min, C: 50°C – 30min, D:50°C – 60min, E: 60°C – 30min, F:60°C – 60min.

La morfología de las superficies de las películas fue evaluada a partir de las imágenes de SEM. La Figura 4.05 muestra que las películas sintetizadas con menores tiempos y temperaturas de reacción presentan poros con al menos dos distribuciones de tamaños, lo cual estaría explicando los valores superiores de permeabilidad alcanzados para estos casos. En estas condiciones, el entrecruzamiento covalente entre las cadenas de quitosano y ácido gálico no está favorecido debido a la menor energía térmica del sistema. Este tipo de entrecruzamiento fue explicado por Strauss & Gibson (2004) y puede verse en la Figura 4.06. Por el contrario, a mayores tiempos y mayores temperaturas, las superficies de las películas fueron aumentando su homogeneidad, sugiriendo la presencia de una matriz altamente entrecruzada. Esto puede deberse a una mayor capacidad de interacción entre quitosano y ácido gálico bajo esas condiciones.



**Fig. 4.06.** Mecanismo de reacción de compuestos fenólicos con cadenas laterales de grupos amino

Los parámetros de color fueron determinados sobre las mismas películas. De acuerdo con la Tabla 4.02, para el parámetro  $a^*$  se observa que este patrón tiene valores altos para condiciones de reacción a altas temperaturas, y que todos los valores obtenidos son positivos, lo cual indica que en este caso el color rojo presenta una mayor intensidad en todas las condiciones. Con respecto al parámetro  $b^*$ , existe una variación desde valores negativos para temperaturas y tiempo menores, hacia valores positivos, a medida que aumentan las mismas. Esto indicaría diferencia de intensidad con la modificación de las condiciones, desde azul hacia

amarillo. Por último, la luminosidad  $L^*$  disminuye con el aumento de los valores de las condiciones. Claramente se puede observar que existe un pardeamiento de las películas mientras la reacción es sometida a mayores temperaturas y tiempos.

**Tabla 4.02.** Parámetros CIELab para diferentes condiciones de reacción de películas.

	Tiempo	Temperatura	L	a	b	$\Delta E^*$
REF	10	25	88.96	1.85	-2.45	
1	30	40	86.61	1.93	-2.18	2.36
2	60	40	86.18	1.91	-2.30	2.78
3	30	50	86.81	1.90	-2.17	2.17
4	60	50	84.93	2.38	-0.07	4.71
5	30	60	84.39	2.01	0.77	5.59
6	60	60	84.72	2.15	1.83	6.03

La variación de color  $\Delta E^*$  es mayor para la película generada bajo las condiciones de reacción de 60° C y 60 minutos, mientras que es menor para 50° y 30 minutos. No existe un parámetro definido respecto a que valor de  $\Delta E^*$  permite que la diferencia entre muestras sea significativa, pero a modo general se puede utilizar la Tabla 4.03:

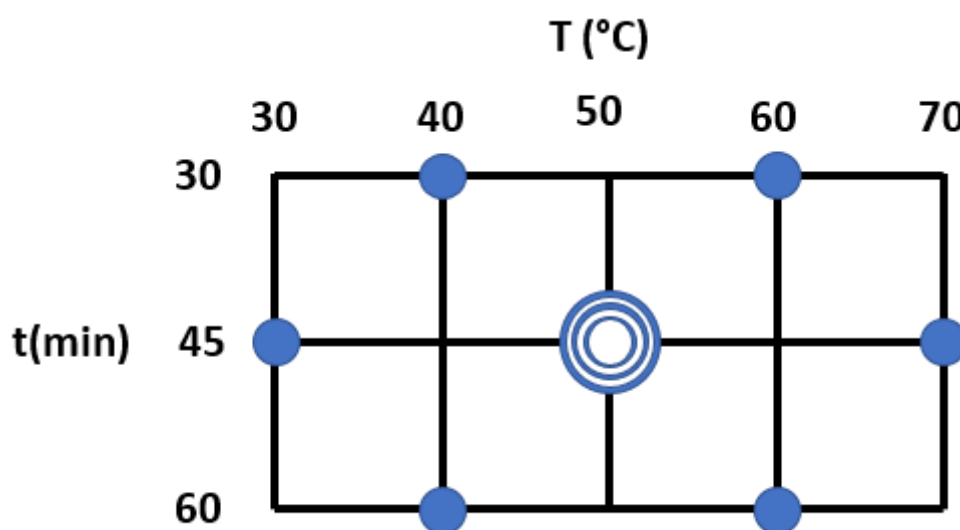
**Tabla 4.03.** Aceptabilidad general de las diferencias de color en  $\Delta E$ .

Grado	Nivel de diferencia
$\Delta E^* < 1$	Imperceptible
$\Delta E^* < 2$	Mínima
$\Delta E^* < 3$	Aceptable
$\Delta E^* < 5$	Marcada
$\Delta E^* = 5$	Muy marcada

Teniendo en cuenta lo anterior, para las muestras 1, 2 y 3 las diferencias serían aceptables, para la muestra 4 se presentaría una diferencia marcada de la coloración, y para el resto muy marcada. Se aclara que el resultado de este análisis del color no implica que debamos descartar dichas muestras, sino que hay una diferencia significativa en la coloración de estas.

## DISEÑO DE EXPERIMENTO Y METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Para este diseño también se siguió utilizando el modelo planteado por Doehlert (1970). En este caso, y en base a los resultados encontrados en el análisis exploratorio anterior, la temperatura se definió como un factor con cinco niveles ( $X_1$ : 30, 40, 50, 60, 70 °C), ya que temperaturas menores simularían las condiciones a temperatura ambiente, y temperaturas mayores provocaron que la reacción no pueda llevarse a cabo correctamente en el equipo por problemas de sobrecalentamiento. Por otro lado, el tiempo se estableció como un factor a tres niveles ( $X_2$ : 30, 45, y 60 min). El diseño de experimento puede verse reflejado en el esquema de la Figura 4.07. Las variables de respuesta seleccionadas fueron: TPC ( $Y_1$ ), DPPH ( $Y_2$ ), TS ( $Y_3$ ), E ( $Y_4$ ), WVT ( $Y_5$ ), y P ( $Y_6$ ). Nuevamente, las variables de respuesta se evaluaron después de realizar 9 ensayos, donde seis de ellas fueron las películas obtenidas de diferentes condiciones de reacción. Las pruebas restantes corresponden al punto central según el modelo de Doehlert para dos factores. Se repite el modelo polinómico de segundo grado explicado en el capítulo anterior para determinar los valores predichos de las respuestas.



**Fig. 4.07.** Diseño de experimento según Doehlert aplicado a la preparación de películas de quitosano (1% P/P) con ácido gálico (1% P/P) y sorbitol (3.62% P/P), donde los puntos representan las películas preparadas.

Los modelos de regresión de cada variable de respuesta estudiada y el análisis estadístico se realizaron con el software Statgraphics Centurion XVI (v16.1, EE. UU.). La superficie de respuesta se estimó a partir de datos experimentales con un intervalo de confianza del 95%.

Se optimizó la superficie de respuesta para obtener las condiciones de reacciones óptimas. Después de eso, se prepararon películas basadas en quitosano utilizando las condiciones óptimas predichas por las superficies de respuesta, y los datos experimentales se compararon con los valores teóricos, lo que permitió validar el desempeño de respuesta del modelo.

Los resultados se expresaron como la media de tres repeticiones. Los datos se analizaron mediante ANOVA y los resultados se compararon mediante la prueba de Fisher a un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico INFOSTAT (2017).

### SUPERFICIES DE RESPUESTA

La disposición del diseño para las composiciones de las mezclas y los resultados experimentales de las variables dependientes en las diferentes películas se presentan en la Tabla 4.04.

**Tabla 4.04.** Valores promedios experimentales de las respuestas obtenidas en el diseño experimental.

Run	Variables		Respuestas					
	$X_1$	$X_2$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$	$Y_5$	$Y_6$
	<b>T</b> °C	<b>t</b> min	<b>TPC</b> $\frac{mg\ GA}{mg\ film}$	<b>DPPH</b> $\frac{\mu mol\ trolox}{g\ film}$	<b>TS</b> MPa	<b>E</b> MPa	<b>WVT</b> $\frac{g}{m^2 \cdot h}$	<b>P</b> $\frac{g \cdot mm}{mm\ Hg \cdot m^2 \cdot h}$
1	40	30	0,057 ± 0,01a	3,15 ± 1,00a	5,32 ± 0,65a	81,60 ± 13,55a	62,62 ± 22,00a	0,41 ± 0,16a
2	40	60	0,064 ± 0,06a	3,60 ± 0,59a	2,26 ± 1,22a	63,26 ± 44,15b	74,03 ± 15,41a	0,40 ± 0,08a
3	60	30	0,060 ± 0,07a	3,35 ± 0,39a	6,04 ± 0,98a	89,16 ± 8,11a	42,96 ± 3,46b	0,16 ± 0,03b
4	60	60	0,060 ± 0,05a	3,15 ± 0,47a	8,22 ± 1,01a	84,73 ± 18,08a	45,31 ± 4,11b	0,20 ± 0,07c
5	30	45	0,074 ± 0,06a	2,94 ± 0,61a	2,78 ± 0,50a	8,50 ± 2,28c	40,54 ± 10,35b	0,17 ± 0,03b
6	70	45	0,066 ± 0,07a	1,81 ± 0,79c	3,32 ± 1,45a	8,97 ± 1,87c	32,76 ± 5,05b	0,11 ± 0,01d
7	50	45	0,076 ± 0,04a	2,73 ± 0,33b	2,07 ± 0,52a	6,53 ± 0,39c	32,31 ± 1,15b	0,11 ± 0,01d
8	50	45	0,069 ± 0,04a	2,38 ± 0,34b	1,49 ± 0,32a	6,28 ± 0,32c	37,29 ± 1,31b	0,12 ± 0,01d
9	50	45	0,072 ± 0,04a	2,46 ± 0,35b	4,57 ± 1,51a	9,60 ± 1,51c	40,30 ± 3,28b	0,12 ± 0,01d

Valores seguidos por la misma letra dentro de una misma respuesta implica diferencias no significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores. T: temperatura – t: tiempo – TPC: polifenoles totales – DPPH: capacidad antioxidante DPPH – TS: resistencia a la tracción – E: módulo de Young – WVT: tasa de transferencia al vapor de agua – P: permeabilidad.

La ecuación 3.01 se utilizó para ajustar la superficie de respuesta de los datos experimentales para cada muestra investigada, como se muestra en la Tabla 4.05. Puede observarse, además, que las variables de respuesta se ajustaron correctamente para todas las respuestas ya que alcanzaron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores a 0,75. De esta manera, todas las variables de respuestas investigadas se incluyeron en el proceso de optimización. La naturaleza de la relación entre las variables independientes y las respuestas investigadas se representó mediante una superficie de respuesta tridimensional, que se generó a partir de la ecuación de regresión, como se puede ver en las Figuras 4.08 a 4.13.

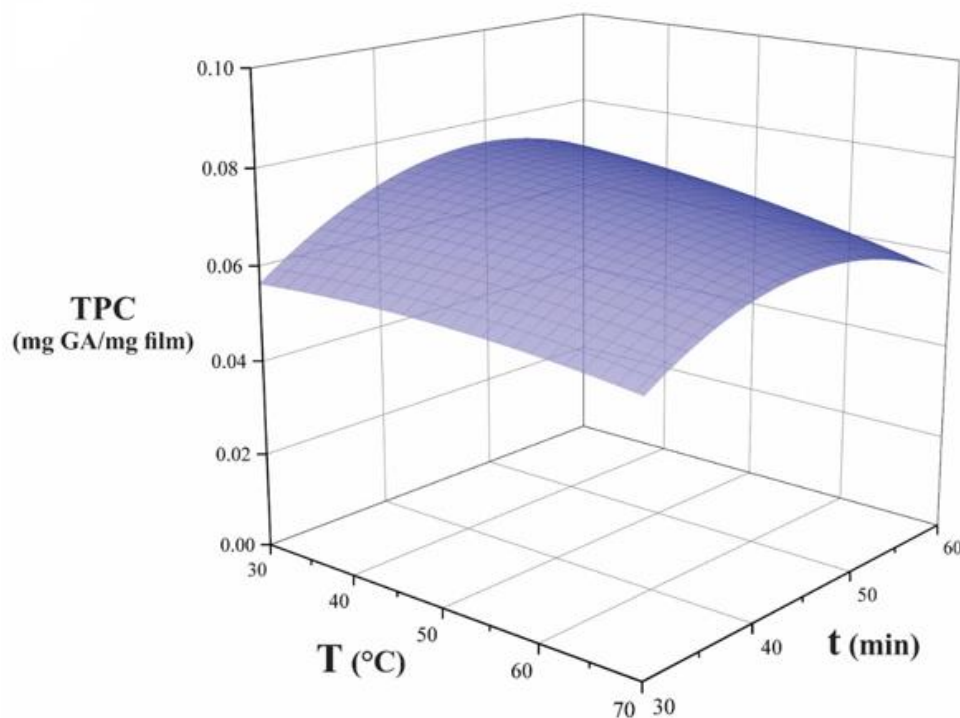
**Tabla 4.05.** Ecuaciones polinomiales y coeficiente de determinación para las respuestas de las variables investigadas respecto a las variables independientes utilizadas en la formulación de películas.

Ecuación polinómica de 2 <sup>do</sup> grado	$R^2$
$Y_1 = -0.0671 + 0.0008 X_1 + 0.0053 X_2 - 5.3648 \times 10^{-6} X_1^2 - 9.6965 \times 10^{-6} X_1 X_2 - 5.1258 \times 10^{-5} X_2^2$	0.76
$Y_2 = 10.1744 + 0.1246 X_1 - 0.4305 X_2 - 0.0016 X_1^2 - 0.0003 X_1 X_2 + 0.0050 X_2^2$	0.83
$Y_3 = 51.9611 - 0.5683 X_1 - 1.6788 X_2 + 0.0038 X_1^2 + 0.0055 X_1 X_2 + 0.0158 X_2^2$	0.85
$Y_4 = 713.403 - 0.9256 X_1 - 30.2538 X_2 + 0.0028 X_1^2 + 0.0195 X_1 X_2 + 0.3215 X_2^2$	0.90
$Y_5 = 261.711 + 0.7470 X_1 - 10.3301 X_2 - 0.0100 X_1^2 - 0.0081 X_1 X_2 + 0.1212 X_2^2$	0.77
$Y_6 = 2.2857 - 0.0154 X_1 - 0.0793 X_2 + 7.6249 \times 10^{-5} X_1^2 + 8.7864 \times 10^{-5} X_1 X_2 + 8.7805 \times 10^{-4} X_2^2$	0.85

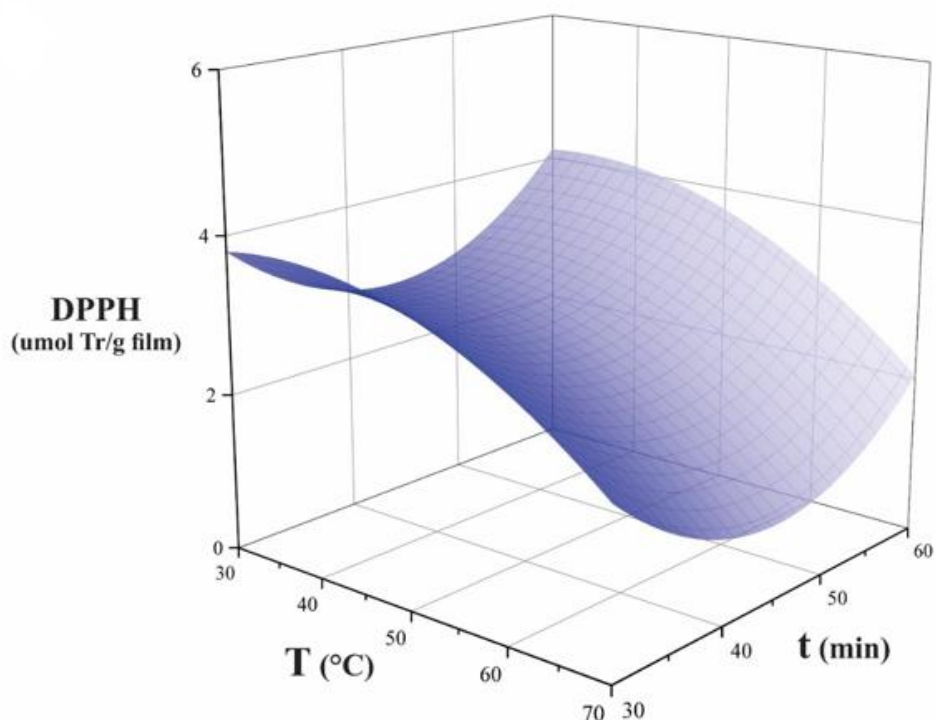
El efecto de la temperatura y el tiempo fue significativo ( $p < 0,05$ ) para TPC ( $Y_1$ ) en el primer efecto de orden lineal ( $X_1$  y  $X_2$ ) y en el efecto cuadrático del tiempo ( $X_2^2$ ), mientras que para DPPH lo fue en el efecto lineal de la temperatura ( $X_1$ ), y en ambos términos cuadráticos ( $X_1^2$  y  $X_2^2$ ). Se encontró que el valor experimental de TPC oscila entre 0,057 y 0,076 mg de ácido gálico / mg de película, mientras que DPPH cambia de 1,81 a 3,60  $\mu\text{mol}$  de Trolox / g de película (Tabla 3.04).

Las Figuras 4.08 y 4.09 muestran que las superficies de respuesta de TPC y DPPH presentan un comportamiento opuesto. En el caso del TPC, no presenta variación el modelo con respecto a la temperatura, pero sí lo hace respecto de la variable tiempo. Se puede establecer que la cantidad de polifenoles va en aumento hasta un tiempo aproximado de 45 minutos y luego decae. Por el contrario, para DPPH, se mantiene el efecto del tiempo, pero de modo inverso:

disminuye hasta los 45 minutos y luego vuelve a crecer. La diferencia está en que en este caso sí influye la variable temperatura, puesto que a medida que la temperatura aumenta, la capacidad antioxidante disminuye.



**Fig. 4.08.** Gráfico de superficie de respuesta de polifenoles totales.

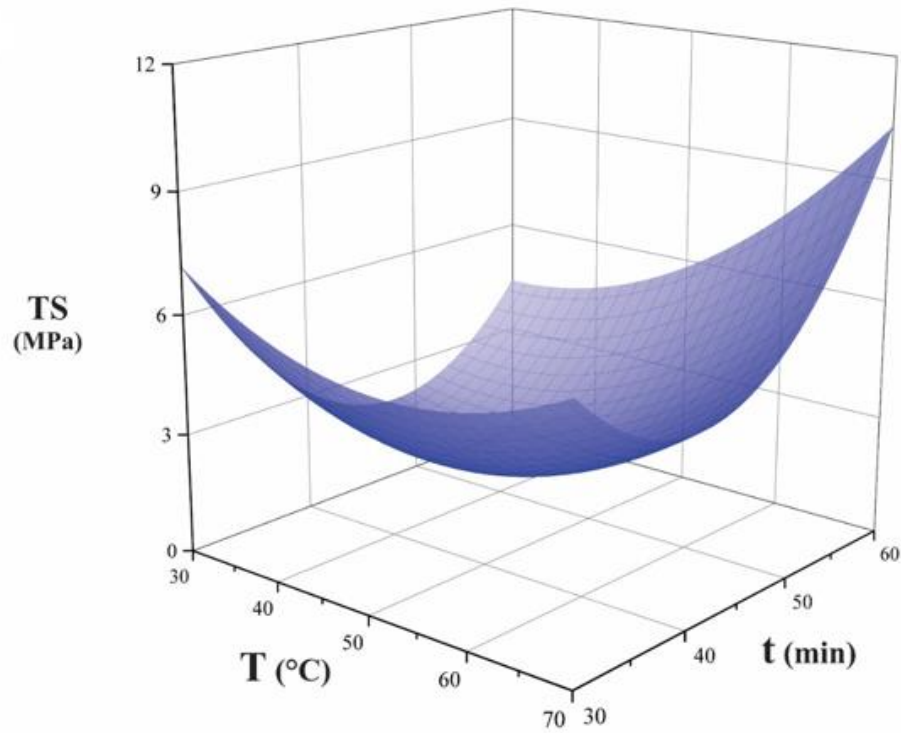


**Fig. 4.09.** Gráfico de superficie de respuesta de DPPH.

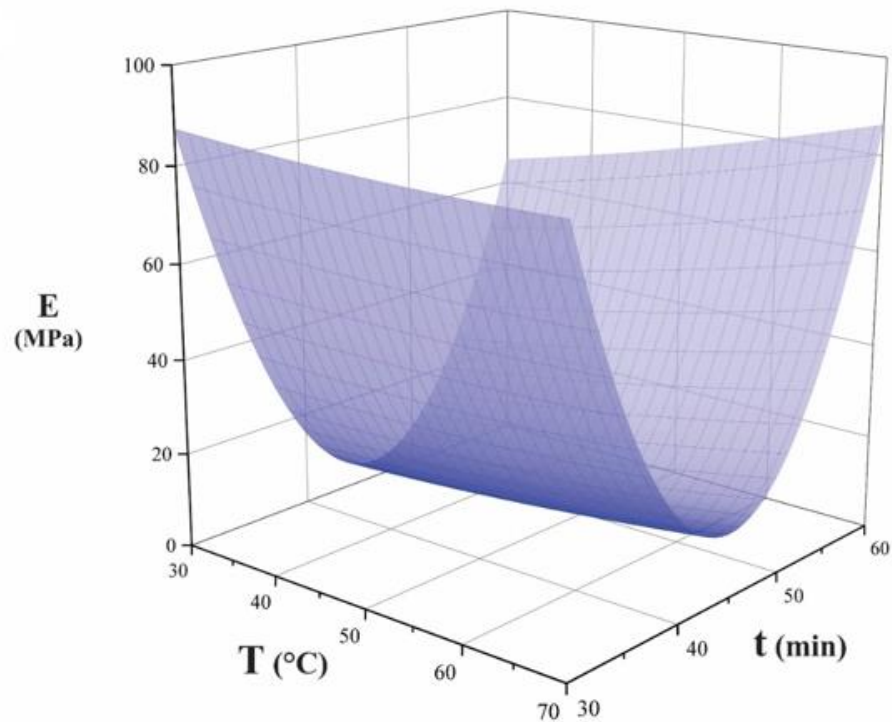
En lo que respecta a las propiedades mecánicas en el caso de la resistencia a la tracción, todas las interacciones fueron significativas ( $p < 0,05$ ) excepto la correspondiente al efecto lineal del tiempo ( $X_2$ ); en cambio, para el módulo de Young solamente lo fue el efecto cuadrático del tiempo ( $X_2^2$ ). Como lo indica la Tabla 4.04, se pudo establecer que para TS los valores experimentales oscilan entre 1,49 y 8,22 MPa, mientras que en el caso de E la variación se dio entre 6,28 y 89,16 MPa.

Las superficies de respuesta de éstas dos propiedades pueden observarse en las Figuras 4.10 y 4.11 y presentan un comportamiento bastante similar en ambos casos, y en concordancia con las figuras representadas en la actividad antioxidante. La resistencia a la tracción presenta una superficie del tipo paracaídas invertido, en donde los máximos se pueden observar en los extremos del gráfico. Para tal caso, las menores resistencias se hayan en torno a los 45 minutos y 50°C, demostrando que un aumento en las variables implica una disminución en el valor de la resistencia, y que al llegar a los valores mínimos nuevamente aumenta. Para el módulo de Young, la temperatura no influye demasiado en la forma de la superficie de respuesta, como ya fue denotado con los efectos significativos.





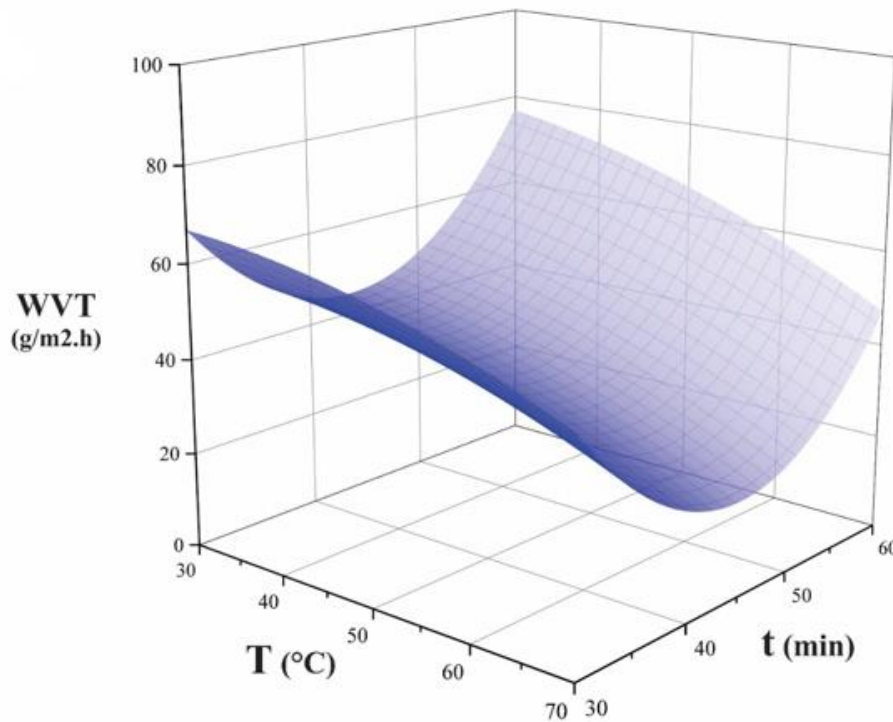
**Fig. 4.10.** Gráfico de superficie de respuesta de la resistencia a la tracción.



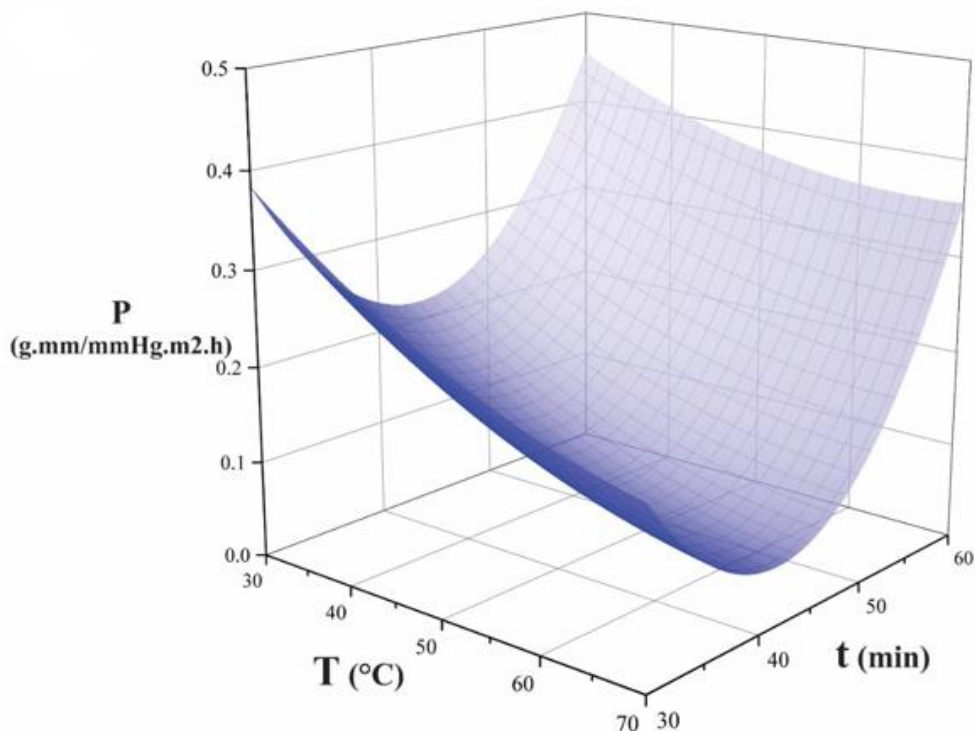
**Fig. 4.11.** Gráfico de superficie de respuesta del módulo de Young.

Por último, tanto para la tasa de transferencia al vapor de agua como a la permeabilidad, tanto el efecto lineal de la temperatura ( $X_1$ ) como el efecto cuadrático del tiempo ( $X_2$ ) fueron significativos ( $p < 0,05$ ). Además, para P también lo fue el efecto lineal de la temperatura ( $X_2$ ). Para WVT los valores experimentales oscilaron entre 32,31 y 74,03  $\text{g/m}^2\text{h}$ , y para P entre 0,11 y 0,41  $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{mmHg}\cdot\text{m}^2\text{h}$  (Tabla 4.04).

En ambos casos vuelve a producirse el comportamiento descrito anteriormente en esta sección con respecto a la forma de las superficies (Figuras 4.12 y 4.13).

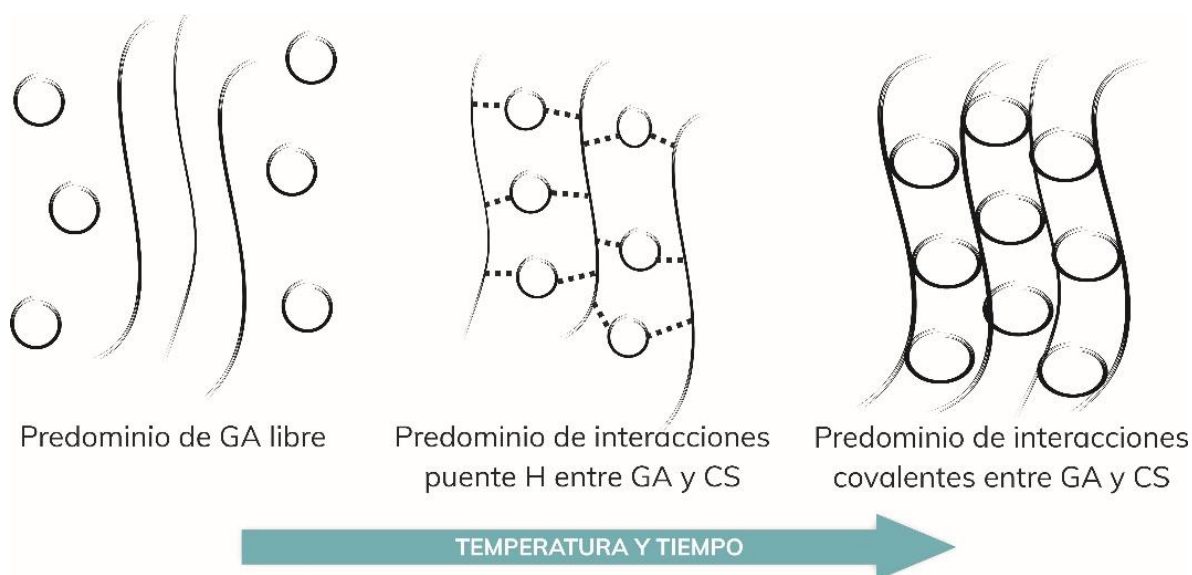


**Fig. 4.12.** Gráfico de superficie de respuesta de la tasa de transferencia al vapor de agua.



**Fig. 4.13.** Gráfico de superficie de respuesta de la permeabilidad.

Las conclusiones obtenidas de las diferentes superficies de respuesta presentadas en este capítulo van en consonancia con lo establecido en el análisis exploratorio previo y puede ser explicado a partir de que, a bajas temperaturas y tiempos más cortos, existe un predominio de ácido gálico en forma libre, con pocas interacciones con las cadenas de quitosano. A medida que se incrementa el valor de las variables, comienzan a aumentar las interacciones del tipo puente hidrógeno entre las cadenas de quitosano y ácido gálico. El entrecruzamiento de cadenas de quitosano mediante formación de puente hidrógeno con ácido gálico comienza a tener relevancia a partir de los 45 minutos de reacción, y con el predominio de enlaces de tipo covalente con el uso de al menos de 50°C, tal como muestra la Figura 4.14.



**Fig. 4.14.** Interacciones entre quitosano y ácido gálico según condiciones de reacción.

## OPTIMIZACIÓN

En un estudio similar al desarrollado en el capítulo anterior, se optimizaron las respuestas para encontrar una película en donde las condiciones de reacción sean óptimas según lo deseado: TPC, DPPH y TS fueron maximizados y E, WVT y P minimizados. A partir de este análisis, el software determinó que las condiciones óptimas de procesado de la mezcla de reacción se encuentran en torno a los 50 minutos de reacción y 60,7 °C de temperatura, las cuales dieron origen a una película de quitosano cuya composición consta de 3.62% P/P de sorbitol, 1% P/P de ácido gálico y un 1% P/P de quitosano. La Tabla 4.06 detalla de manera comparativa los valores predichos y experimentales con su desviación estándar determinados correspondiente para cada variable de respuesta.

**Tabla 4.06.** Valores experimentales predichos versus experimentales en películas realizadas a 50 minutos y 60.7 °C.

		Predicho	Experimental
$Y_1$	TPC (mg gallic acid/mg film)	0.0689	0.0633 ± 0.0050
$Y_2$	DPPH (umol Trolox/g film)	1.9664	1.4440 ± 0.2363
$Y_3$	TS (MPa)	3.9249	3.6986 ± 0.2599
$Y_4$	E (MPa)	17.78	25.00 ± 2.70
$Y_5$	WVT (g/m <sup>2</sup> .h)	31.8679	55.14 ± 3.58
$Y_6$	P (g.mm/mmHg.m <sup>2</sup> .h)	0.1308	0.14 ± 0.02

Se encontró una buena concordancia entre los valores experimentales y predichos para TPC, TS y P. Las mayores diferencias entre el valor predicho y el valor experimental se encontraron para los parámetros E y WVT, mientras que una diferencia intermedia se encontró para DPPH. La variación de E y WVT quizás pueda deberse también a factores experimentales a la hora de llevarse a cabo el experimento. No se descarta una posible mejora a partir del incremento del número de ensayos para estos parámetros. El coeficiente de determinación del modelo completo ( $R^2$ ) es 0,85, el cual apoya el hecho de que el modelo propuesto exhibe un buen ajuste frente a los datos experimentales.

#### VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE MODIFICACIÓN DE CONDICIONES DE REACCIÓN

Por último, se evaluó de manera comparativa los datos correspondientes a los parámetros fisicoquímicos analizados para las películas con igual composición química obtenidas en condiciones normales de reacción (10 minutos y 25 °C) versus las condiciones óptimas (50 minutos y 60.7 °C), como se puede observar en la Tabla 4.07.

**Tabla 4.07.** Comparación de respuestas bajo diferentes condiciones

Respuestas	Condiciones	
	Normales	Óptimas
TPC (mg gallic acid/mg film)	0.037 ± 0.004	0.063 ± 0.005
DPPH (umol Trolox/g film)	4.3 ± 0.8	1.44 ± 0.24
TS (MPa)	7.7 ± 0.4	3.7 ± 0.2
E (MPa)	107 ± 30	25 ± 3
WVT (g/m <sup>2</sup> .h)	67 ± 6	55 ± 3.6
P (g.mm/mmHg.m <sup>2</sup> .h)	0.33 ± 0.02	0.14 ± 0.02

Se puede observar que, en el caso de los ensayos antioxidantes, la modificación de las condiciones implica aumento de la cantidad de polifenoles TPC y disminución de la capacidad antioxidante. Esto se debe a lo explicado anteriormente en este capítulo respecto a la cantidad ácido gálico libre y aquel involucrado en el entrecruzamiento con las cadenas de quitosano, y concuerda claramente con las superficies de respuesta obtenidas. Por otro lado, mecánicamente vemos una disminución en los valores de dichas propiedades, lo cual se observa a partir a la formación de una matriz tridimensional con alto grado de entrecruzamiento y a la reducción de las regiones cristalinas generadas por las cadenas de quitosano. Por último, WVT y P se ven claramente disminuidos, lo cual se pudo observar en las imágenes obtenidas mediante SEM: el tamaño de los poros de las películas va en disminución a medida que se aumentan los tiempos y las temperaturas de reacción.

## BIODEGRADABILIDAD DE PELÍCULAS DE QUITOSANO

Existe un consenso mundial acerca de la disminución de la generación de residuos plásticos, y ante esto, los polímeros biodegradables como el de quitosano, le están ganando la batalla a los polímeros convencionales tales como tereftalato de polietileno (PET). La descomposición química por acción de microorganismos en corto tiempo se presenta entonces como una solución frente al problema planteado.

El compostaje consiste en un proceso biológico que transforma la materia orgánica doméstica o del jardín en humus, mediante la interacción de oxígeno, bacterias y microorganismos. El compost sirve para mejorar las propiedades del suelo.

El proceso de biodegradación de un polímero se puede llevar a cabo en diversos ambientes, en función de dónde finalice la vida útil del producto. Se considera que el compostaje podría ser el medio más favorable, ya que mediante este proceso se consigue valorizar los residuos, obteniendo un compost que puede ser empleado en agricultura, en lugar de simplemente eliminar dichos residuos.

El ensayo de biodegradabilidad fue llevado a cabo según lo descrito en el capítulo de metodologías. En este caso se analizó la biodegradabilidad de las películas obtenidas en los capítulos 3 y 4, las cuales denominaremos Ambiente (AM) y Óptima (OP) respectivamente. Estas películas fueron preparadas por triplicado y fueron dispuestas sobre 2 mallas de acero inoxidable, colocando en cada una de ellas 3 películas realizadas a temperatura óptima y 3 películas realizadas a temperatura ambiente y cubriéndolas con otra malla para evitar roturas durante el período de entierro (Figura 4.15).

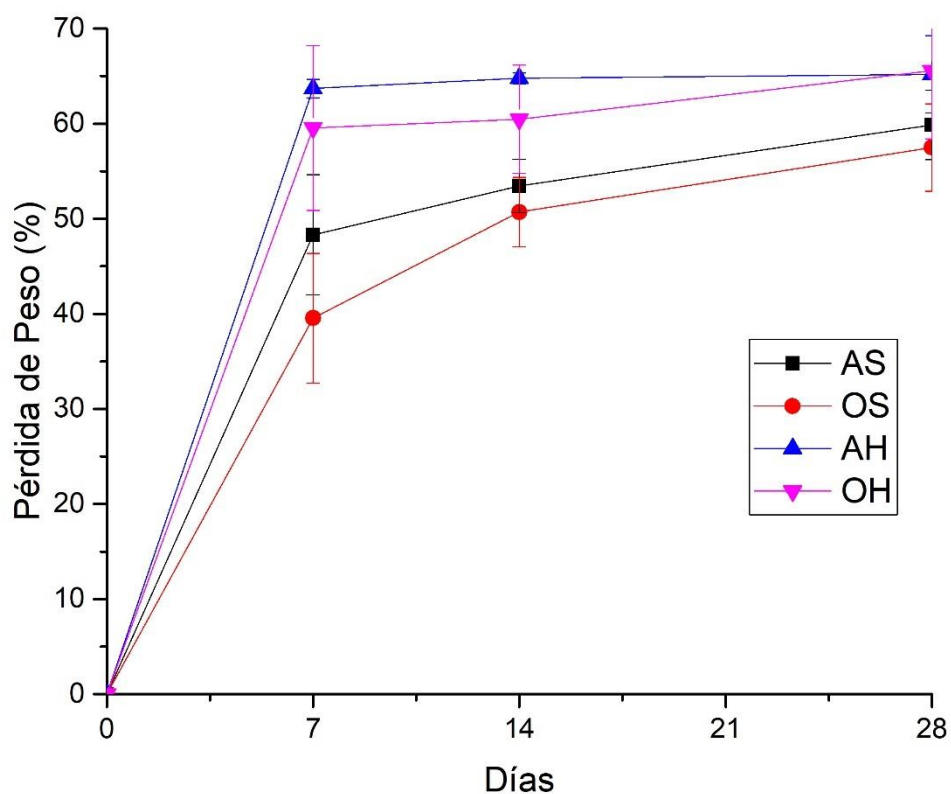


**Fig. 4.15.** Disposición de películas sobre malla de acero previo enterramiento

Las mallas fueron enterradas en dos lugares con diferentes características: el primero, un lugar en donde el sol no incidía de manera directa en ningún momento del día (Lugar H), y otro en donde sí lo hacía (Lugar S).

Las películas se depositaron junto con la malla dentro del pozo y fueron cubiertas con tierra. En cada suelo elegido para realizar el ensayo, una muestra fue tomada para ser sometida a la determinación del % de humedad de esta, mediante la técnica de secado hasta peso constante. El lugar H presentó un % de humedad que varió entre el 55 y el 65% durante la duración del ensayo, mientras que el lugar S presentó un % que varió entre el 35 y el 45%.

El % de pérdida de peso de las películas se pueden observar en la Figura 4.16. Para los dos tipos de películas ensayadas y en los dos lugares donde se llevaron a cabo los ensayos, el comportamiento fue similar. En los primeros 7 días el % de pérdida de peso es de entre el 40 y 60%, y a partir de allí, disminuye la pendiente hasta alcanzar porcentajes que varían entre un 50 y 65%. Las películas enterradas en el lugar H presentaron un % de biodegradabilidad mayor, lo cual se entiende por ser un lugar más favorecido para el desarrollo de microorganismos. Se destaca también que las películas sin tratamiento térmico durante la reacción presentan un % de degradación mayor respecto a las que no lo tienen y lo cual seguramente tiene que ver con una matriz polimérica entrecruzada covalentemente más estable, como se analizó en los capítulos 3 y 4.



**Fig. 4.16.** Pérdida de peso de películas a base de quitosano 1% p/p, ácido gálico 1% p/p y sorbitol 3,62% p/p. AS: película ambiente, lugar seco – OS: película óptima, lugar seco – AH: película ambiente, lugar húmedo – OH: película óptima, lugar húmedo.



## CONCLUSIONES

Este estudio demuestra cómo las condiciones de síntesis modifican las propiedades antioxidantes y físicas de películas a base de quitosano. Se puede concluir que tiempos y temperaturas de reacción mayores contribuyen positivamente las propiedades físicas y mecánicas de las películas, al volverlas más fuertes y menos permeables. Por el contrario, estas variables afectan negativamente a la capacidad antioxidante de la misma, lo cual se asocia a un mayor grado de entrecruzamiento covalente entre ácido gálico y quitosano. Claramente existe una relación de compromiso entre la condición de síntesis utilizada y las propiedades finales del material sintetizado. Se halló que las condiciones óptimas de reacción estarían en 50 minutos y 60.7 °C. La evidencia obtenida a partir de los resultados alcanzados resulta ser prometedora para la aplicación de este tipo de películas como material de envase o cobertura para alimentos.



## CAPÍTULO 5. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS Y SU USO EN LA FORMACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO ACTIVAS

Los aceites esenciales de cítricos (CEO) muestran diferentes bioactividades dependiendo de su composición, especie y origen. El presente capítulo tiene como objetivo encontrar diferencias y similitudes entre diferentes especies de aceites esenciales de cítricos (pomelo, limón, mandarina y naranja) de diferentes orígenes (Argentina, Estados Unidos), en términos de su composición química, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana para encontrar nuevos usos y aplicaciones y, por lo tanto, contribuir a la reutilización de los residuos industriales para fomentar un mundo más amigable con el medio ambiente.

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### PERFIL QUÍMICO Y SENSORIAL

Se detectaron a partir de CG-MS un total de 31 compuestos para los 4 aceites esenciales cítricos (pomelo, limón, mandarina y naranja) de Argentina, Estados Unidos y Comercial (Tabla 5.01). El número de compuestos detectados para cada aceite esencial de planta varió entre cinco para pomelo y veinticinco para limón. Limoneno y mirceno fueron los únicos dos compuestos detectados en las cuatro especies de Argentina y Estados Unidos; mientras que hubo 14 compuestos que solo se detectaron en aceites esenciales de limón (Tabla 5.01).

Los aceites esenciales cítricos extraídos en el presente trabajo no presentan diferencias significativas entre ellos con respecto al color, mostrando una tonalidad de transparente a ámbar claro. Estos aceites esenciales cítricos se caracterizan por su aroma persistente y penetrante, debido casi exclusivamente a la presencia de limoneno y la presencia de otros compuestos secundarios.

Los aceites esenciales de pomelo mostraron un perfil químico similar entre los diferentes orígenes, siendo mirceno (0,7-1,1% P/P) el segundo compuesto principal detrás de limoneno (95,3-98,2% P/P).

El contenido de limoneno en limón es generalmente más bajo que en los otros cítricos (60,0-72,1% P/P), mientras que los monoterpenos  $\gamma$ -terpineno (8,8-10,5% P/P) y  $\beta$ -pineno (5,3-

11,4% P/P) se encuentran en mayores cantidades. El aceite esencial de limón es rico en otros tipos de compuestos tales como alcoholes, aldehídos, ésteres monoterpenos y sesquiterpenos. En el caso de los aceites comerciales, todos estos compuestos se encontraron en cantidades más bajas o nulas.

El perfil de la curva de GC-MS de los aceites de mandarina mostró que el contenido de limoneno es menor (72,3% P/P) en el origen argentino, mientras que el contenido de  $\gamma$ -terpineno es mayor (18,6% P/P).

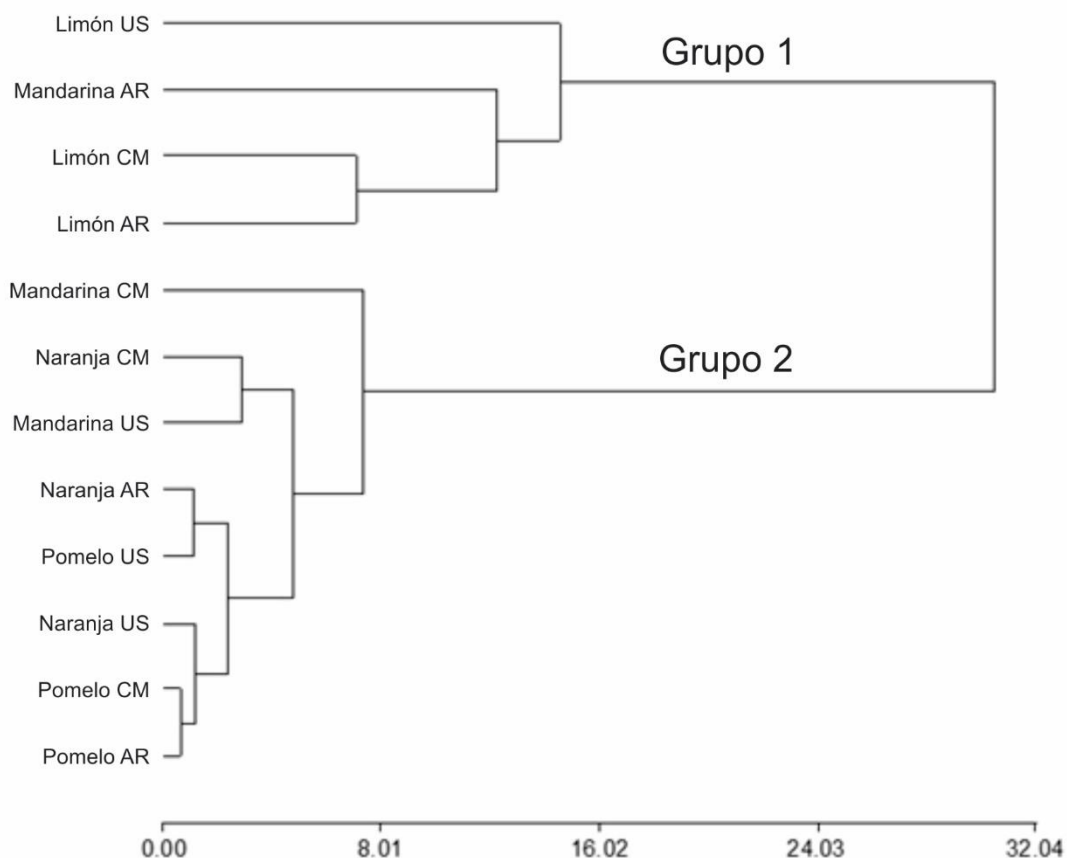
Finalmente, el aceite esencial de naranja es rico en limoneno (96,1-97,3% P/P), con mirceno (1,1-1,3% P/P) y linalool (0,1-0,6% P/P) como componentes menores.

Un análisis de clúster (Figura 5.01) demostró que existen dos grupos bien definidos que separan los tres tipos de limón y aceite esencial de mandarina de origen argentino del resto de los aceites esenciales cítricos. Esto se debe a que el contenido de limoneno en ese grupo es significativamente más bajo que el resto (Tabla 5.01).

**Tabla 5.01.** Composición química de los aceites esenciales de pomelo, limón, mandarina y naranja de tres orígenes diferentes: Argentina (AR), Estados Unidos (US) y comercial (CM)<sup>a</sup>

RI	Compuestos	Pomelo			Limón			Mandarina			Naranja		
		AR	US	CM	AR	US	CM	AR	US	CM	AR	US	CM
924	$\alpha$ -thujene						0,4	0,6 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1				
939	$\alpha$ -pinene				0,9 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,0	2,1	1,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2				0,5
974	sabinene		0,2 $\pm$ 0,3			1,3 $\pm$ 0,0	1,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0	0,3	0,6 $\pm$ 0,1		
979	$\beta$ -pinene				5,3 $\pm$ 1,1	11,4 $\pm$ 1,5	11,0	1,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0				1,3
994	myrcene	0,7 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,2	0,9	1,0 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,9	1,2 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,0		1,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0	1,1
1001	$\delta$ -carene	0,3 $\pm$ 0,2								1,1			
1015	$\alpha$ -terpinene				0,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,1		0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0				
1024	p-cymene				1,6 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,1	0,9	1,8 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,3	2,4			
1025	$\beta$ -phellandrene	0,3 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1		0,9 $\pm$ 0,3							0,1 $\pm$ 0,1	
1029	1,8-cineole				0,8 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0					0,5 $\pm$ 0		
1038	limonene	98,0 $\pm$ 2,2	95,3 $\pm$ 1,1	98,2	72,1 $\pm$ 4,5	60,0 $\pm$ 9,1	69,7	72,3 $\pm$ 1,8	93,6 $\pm$ 4,5	90,3	96,1 $\pm$ 0,4	91,5 $\pm$ 0	97,3
1044	$\beta$ -ocimene		0,2 $\pm$ 0,2	0,4	0,1 $\pm$ 0							0,3 $\pm$ 0	
1068	$\gamma$ -terpinene				8,8 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,5	10,1	18,6 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 2,4	3,9	0,2 $\pm$ 0		
1088	isoterpinolene				0,3 $\pm$ 0,2								
1086	$\alpha$ -terpinolene				0,2 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1		0,8 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0	0,1			
1095	linalool		0,1 $\pm$ 0						0,4 $\pm$ 0,2		0,6 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0	0,1
1174	terpinen-4-ol				0,3 $\pm$ 0,2				0,1 $\pm$ 0				
1186	$\alpha$ -terpineol				0,4 $\pm$ 0,3								
1227	nerol				0,1 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,2							
1235	neral				1,8 $\pm$ 0	2,5 $\pm$ 1,7							
1249	geraniol				0,1 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0,2							
1254	linalyl acetate				0,1 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,3							
1264	geranial				2,0 $\pm$ 0,9	3,2 $\pm$ 2,1	1,4						
1359	neryl acetate				0,9 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,3							
1379	geranyl acetate				0,3 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,0	0,4						
1410	<i>trans</i> -caryophyllene	0,2 $\pm$ 0,2			0,7 $\pm$ 0								
1503	$\alpha$ -farnesene				0,7 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0			0,1 $\pm$ 0				
1505	$\beta$ -bisabolene				1,1 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0							

<sup>a</sup> Expresado como el promedio de dos muestras  $\pm$  SD, excepto para origen CM el cual corresponde a una muestra.

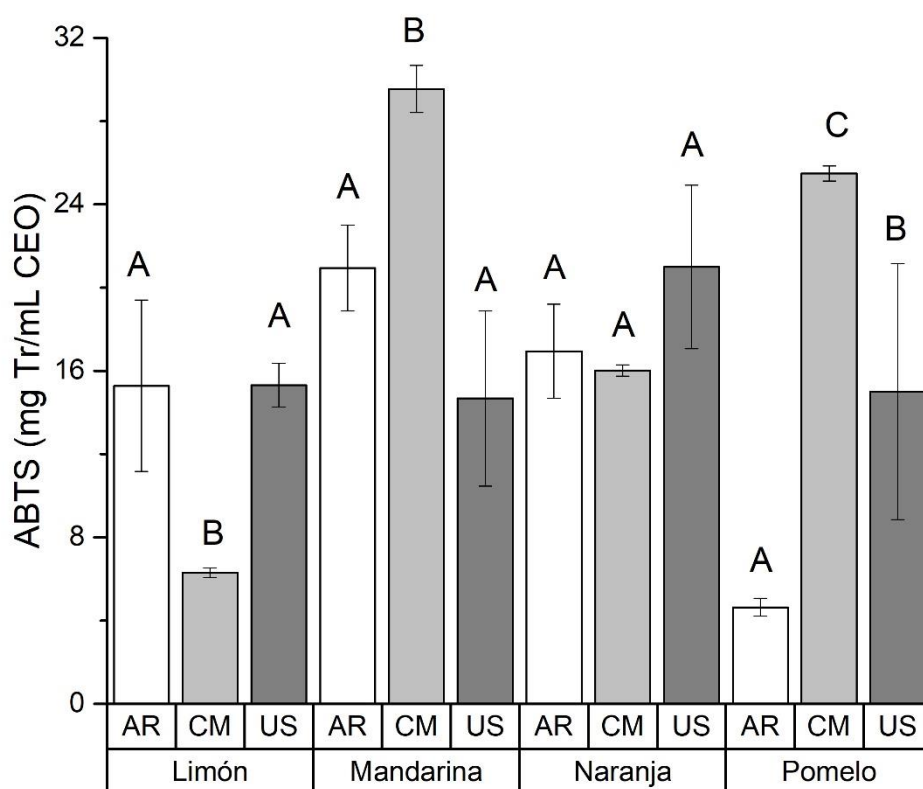


**Fig. 5.01.** Clúster de aceites esenciales de cítricos de diferentes especies y orígenes (AR: Argentina, US: Estados Unidos, CM: Comercial) obtenidos por distancia euclidiana y método de vinculación promedio.

#### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Las Figuras 5.02 a 5.05 muestran los resultados de los ensayos de ABTS, FRAP, DPPH y CUPRAC para determinar la capacidad antioxidante de los aceites esenciales cítricos (pomelo, limón, mandarina y naranja) de los diferentes orígenes (Argentina, Estados Unidos y comercial). En todas las figuras, las barras indican la desviación estándar positiva (SD) obtenida de dos muestras diferentes en cada aceite esencial cítrico y origen. Para un aceite esencial cítrico de origen dado, los promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ , DGC).

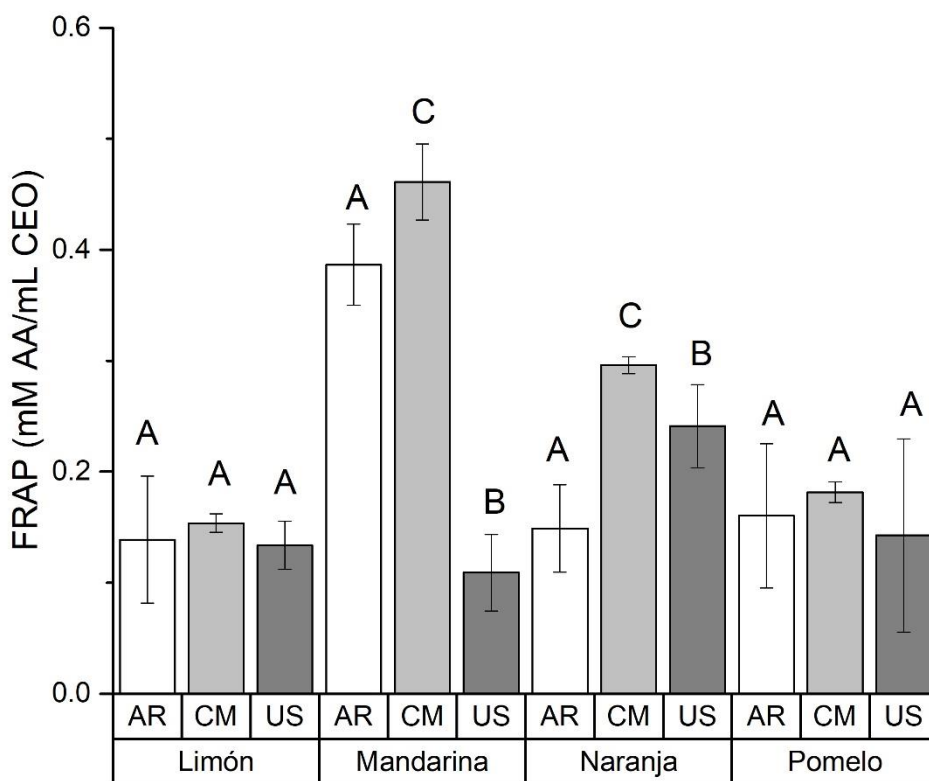
*Ensayo ABTS.* Las muestras de mandarina mostraron la mayor actividad antioxidante, más específicamente el tipo CM (25,84 mg TR/mL CEO), mientras que la muestra de pomelo AR mostró la actividad antioxidante más baja (4,64 mg TR/mL CEO). Solo la naranja mostró un perfil similar entre los tres orígenes, mientras que el limón presentó un comportamiento diferente (Figura 5.02).



**Figura 5.02.** Actividad antioxidante de aceites esenciales de cítricos de Argentina (blanco), Estados Unidos (gris claro) y comerciales (gris oscuro) determinada por el ensayo ABTS.

*Ensayo FRAP.* Las muestras de pomelo y limón mostraron una actividad antioxidante similar, con valores de FRAP de alrededor de 0,20 mmol AA/mL CEO (Figura 5.03). El valor más alto de este ensayo es para los tipos de aceite esencial de mandarina AR y CM (alrededor de 0,40 mmol de AA/mL CEO). Esto podría atribuirse al hecho de que sus perfiles químicos de esas muestras mostraron valores más altos de monoterpenos hidrocarbonados, mientras que el

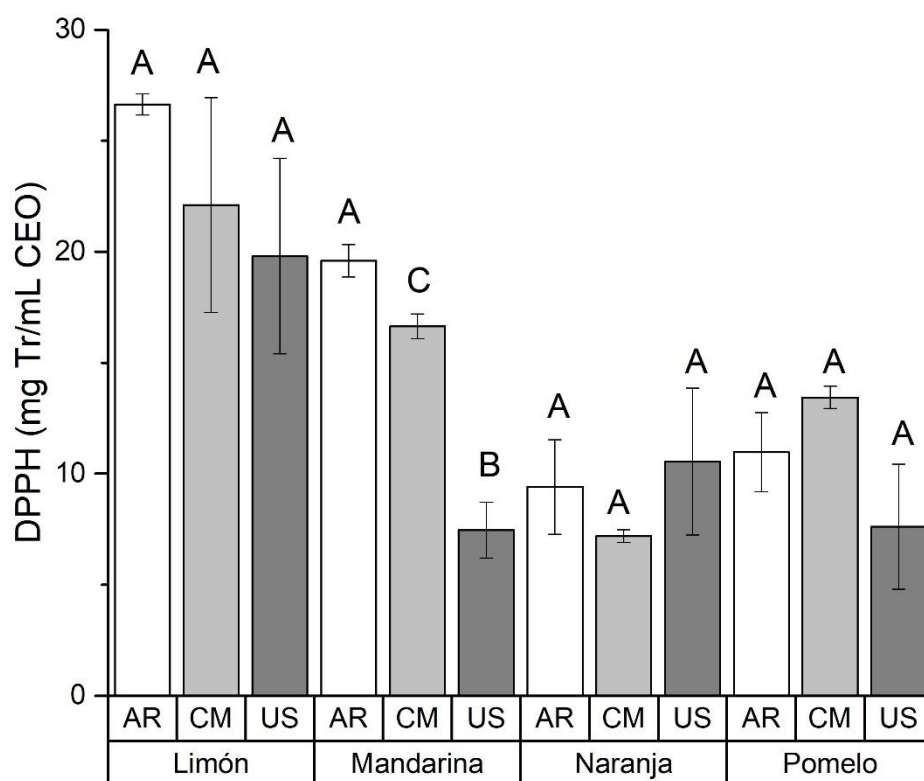
aceite esencial proveniente de EE.UU, contiene alcohol-monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados (Tabla 5.01).



**Fig. 5.03.** Actividad antioxidante de aceites esenciales de cítricos de Argentina (blanco), Estados Unidos (gris claro) y comerciales (gris oscuro) determinada por el ensayo FRAP.

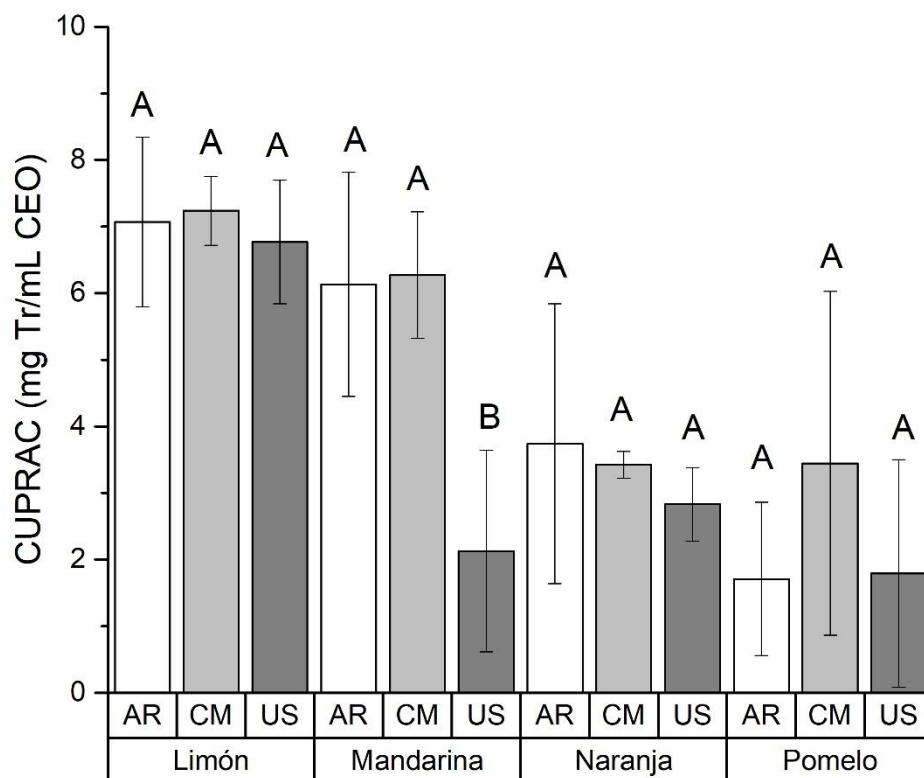
*Ensayo DPPH.* Los valores TEAC mostraron diferentes tendencias antioxidantes en comparación con ABTS, lo cual sugiere que estos ensayos tienen un mecanismo de acción diferente. Los aceites esenciales de limón mostraron los tres valores más grandes de DPPH, independientemente de su origen (AR: 26,63; US: 19,8; CM: 22,11 mg TR/mL CEO). Por otro lado, los valores más bajos correspondieron a pomelo y a naranja (Figura 5.04).





**Fig. 5.04.** Actividad antioxidante de aceites esenciales de cítricos de Argentina (blanco), Estados Unidos (gris claro) y comerciales (gris oscuro) determinada por el ensayo DPPH.

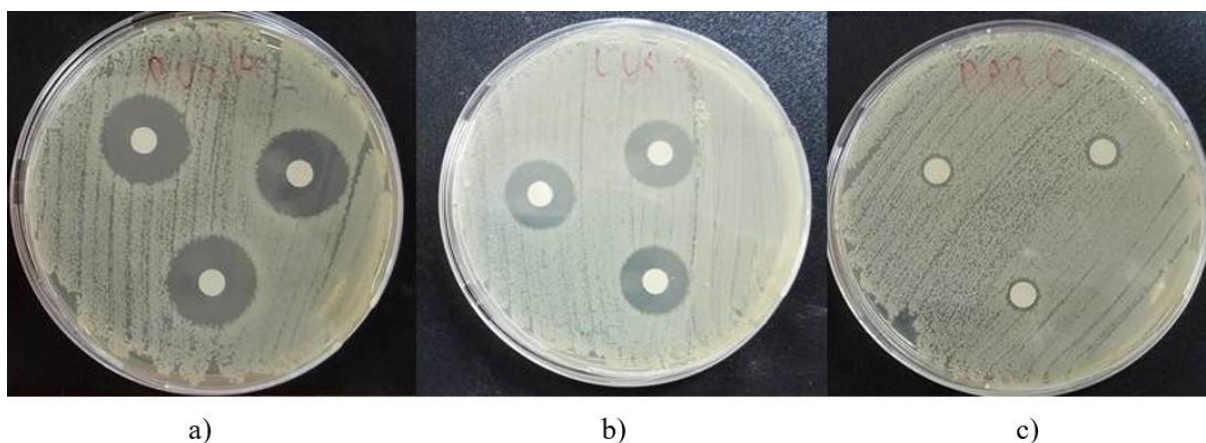
*Ensayo CUPRAC.* Se puede encontrar cierta similitud entre los valores TEAC de este ensayo si lo comparamos con los valores TEAC del ensayo DPPH. Aunque los valores fueron más bajos en el ensayo DPPH, nuevamente los aceites esenciales de limón mostraron la mejor actividad antioxidante con valores de alrededor de 7 mg TR/mL CEO. Por el contrario, los aceites esenciales de pomelo argentino o estadounidense mostraron los valores más bajos, con un valor TEAC por debajo de 2 mg TR/mL CEO (Figura 5.05).



**Fig. 5.05.** Actividad antioxidante de aceites esenciales de cítricos de Argentina (blanco), Estados Unidos (gris claro) y comerciales (gris oscuro) determinada por el ensayo CUPRAC.

#### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo la zona de inhibición (IZ) y determinando los valores de CIM y CBM. La Tabla 5.02 presenta los resultados de los diámetros de la IZ de todas las cepas de bacterias en estudio a partir de la aplicación de todos los aceites esenciales cítricos, incluido el diámetro del disco de papel (5 mm). En el estudio se observó una amplia variación en las propiedades antimicrobianas de los aceites, con un diámetro de la zona de inhibición en el rango de 6 a 24 mm (Figura 5.06).



**Fig. 5.06.** Imagen representativa de las zonas de inhibición de aceites esenciales contra las bacterias estudiadas. (a) Aceite esencial de pomelo, origen estadounidense, contra *E. coli*. (b) Aceite esencial de limón, origen estadounidense, contra *L. mesenteroides* MS1. (c) Aceite esencial de pomelo, origen argentino, contra *L. plantarum* ATCC 8014.

Los aceites esenciales de pomelo y limón, de origen argentino y estadounidense, mostraron una actividad antimicrobiana consistentemente fuerte contra todas las bacterias analizadas evidenciando un diámetro medio de zona de inhibición de 7,5 mm y 8,9 mm, respectivamente. Tanto el aceite esencial de pomelo como el de limón fueron más efectivos para inhibir la bacteria *E. coli* que el resto de las cepas de bacterias, con diámetros de inhibición que varían entre 5,83 y 21,27 mm. El aceite esencial de mandarina mostró una actividad moderada contra la mayoría de las bacterias analizadas, y siendo la de mayor actividad antimicrobiana sobre *E. coli* con un diámetro promedio de IZ de 6,72 mm. Resultados similares fueron encontrados por Guo *et al.* (2018) quienes estudiaron diferentes aceites esenciales cítricos originados en China y encontraron actividad antimicrobiana de aceite esencial de limón (11.1 mm) y aceite esencial de mandarina (7.01 mm) frente a *E. coli* lo cual concuerda con nuestros resultados. La acción de los aceites esenciales cítricos contra las bacterias patógenas ya fue informada por Tao *et al.* (2009), cuando el aceite esencial obtenido de la cáscara de naranja dulce de Bingtang (*Citrus sinensis* Osbeck), rico en limoneno (77.5%) fue efectivo en la inhibición de *E. coli* ATCC 25922 (17.21 mm IZ). Del mismo modo, Fisher y Phillips (2008) informaron una fuerte actividad antibacteriana de los aceites esenciales cítricos de naranja dulce (*Citrus sinensis*), bergamota (*Citrus bergamia*) y limón (*Citrus limon*), que están constituidos principalmente por limoneno (45–95%) contra *E. coli* O157, *S. aureus* y *B. cereus*. El aceite esencial de naranja presentó una débil zona de inhibición (*L. plantarum* ES147, *L. plantarum* ATCC 8014, *E. coli*) o

no pudo inhibir el crecimiento de las bacterias estudiadas (*L. mesenteroides* MS1) (Tabla 4.02). Estos resultados concordaron con los estudios de Fernández-López *et al.* (2005), quienes determinaron que el aceite esencial de naranja no es efectivo contra *L. mesenteroides*. Además, Ambrosio *et al.* (2017) encontraron resultados similares a los hallados en este trabajo, respecto del diámetro IZ para aceite esencial de naranja (7.2 mm) contra *L. plantarum*. Por otro lado, la Tabla 4.02 refleja la casi nula actividad antimicrobiana de los aceites comerciales, lo cual va en concordancia con los perfiles químicos de estos de la Tabla 4.01. Claramente se observa que los aceites comerciales presentan una menor cantidad de compuestos respecto de los extraídos, lo cual quizás pueda atribuirse a que estos aceites esenciales no son naturales, sino que son sintetizados en la industria.

**Tabla 5.02.** Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales evaluados contra bacterias benéficas (*L. plantarum* ATCC 8014, *L. plantarum* ES 147), bacterias de crecimiento alimenticio (*L. mesenteroides* MS1) y bacterias patógenas (*E. coli*)<sup>a, b</sup>

Aceite Esencial	Origen	Zona de inhibición (mm)*			
		<i>L. plantarum</i> ES 147	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. mesenteroides</i> MS1	<i>E. coli</i>
Limón	Argentina	10,00 ± 3,41B	7,17 ± 2,56 A	7,00 ± 2,28 A	14,50 ± 3,15 B
	US	8,00 ± 0,63 B	8,83 ± 1,94 A	10,5 ± 1,76 B	16,50 ± 1,05 B
	Comercial	n.i.	6,00 ± 0,00 A	n.i.	8,00 ± 0,0 A
Mandarina	Argentina	7,67 ± 0,52 C	6,67 ± 0,82 B	n.i.	6,50 ± 0,55 A
	US	6,33 ± 0,52 B	6,33 ± 1,21 B	n.i.	8,67 ± 4,13B
	Comercial	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Naranja	Argentina	7,17 ± 0,98 B	n.i.	n.i.	5,50 ± 0,63 A
	US	7,00 ± 0,89 B	n.i.	n.i.	6,00 ± 0,50 A
	Comercial	n.i.	n.i.	n.i.	6,00 ± 0,0 A
Pomelo	Argentina	5,00 ± 0,10 A	7,67 ± 0,52 B	n.i.	5,83 ± 0,98 A
	US	8,33 ± 1,37B	10,00 ± 0,89 C	7,00 ± 0,89 B	21,27 ± 1,60 B
	Comercial	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

\* Área de inhibición que incluye un diámetro de disco de 5 mm, expresada como la media de tres réplicas ± SD.

n.i. sin inhibición

a) Los medios seguidos por la misma letra en la misma columna para cada aceite esencial no son significativamente diferentes (P < 0,05).

b) Valor promedio expresado como la media de cuatro repeticiones en cada origen (12 repeticiones).

En nuestro estudio, el contenido de limoneno se detectó como compuesto principal en todos los extractos de aceites esenciales cítricos (Tabla 5.01), pero se observó una gran variación en la cantidad de este compuesto en los diferentes aceites (98,2% P/P para el aceite esencial de

origen comercial de pomelo y 60,02% P/P para el aceite esencial de origen estadounidense de limón). Debido a las relaciones entre la actividad antibacteriana de estos aceites esenciales cítricos y la composición química de los mismos, es posible sugerir que la actividad antibacteriana de ambos aceites se debió a la presencia de compuestos menores y no limoneno. Resultados similares fueron encontrados por varios autores: Serra *et al.* (2018) estudiaron la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* MS1 contra los aceites esenciales cítricos y concluyeron que limoneno no presentaba efecto bactericida sobre esta bacteria; Fisher y Phillips (2006) demostraron que limoneno, el componente principal de los aceites esenciales cítricos, no presenta actividad antibacteriana alguna, mientras que linalool presenta una actividad antibacteriana elevada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157 y *Campylobacter jejuni*.

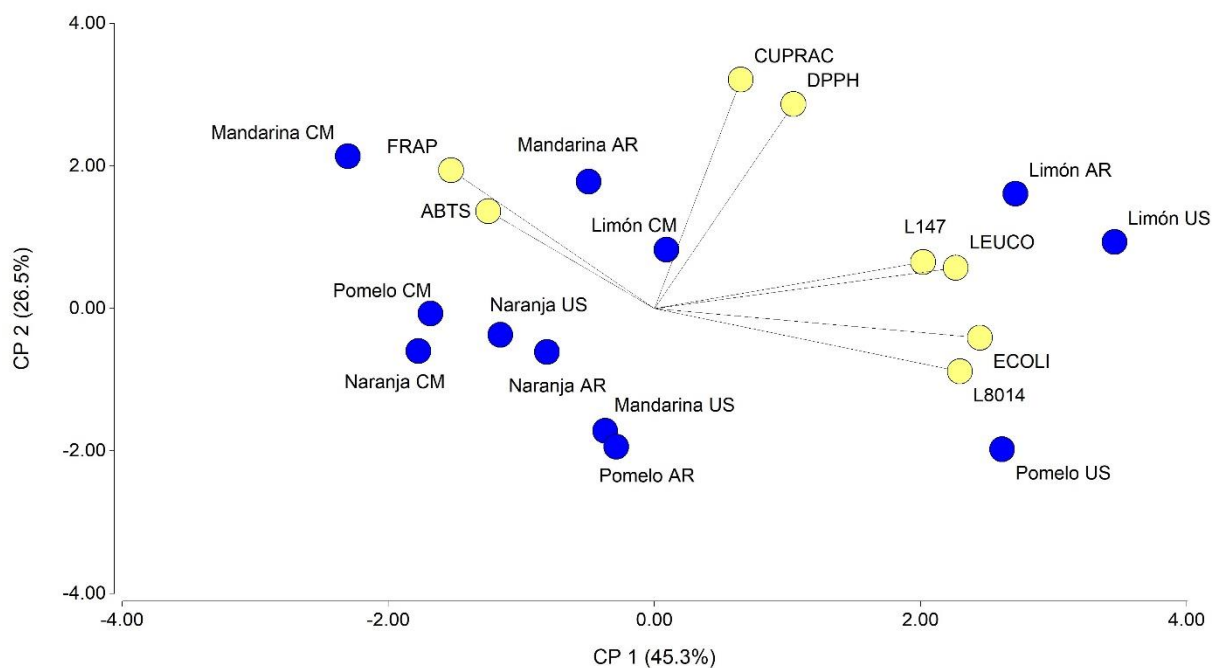
En general, se cree que los aceites esenciales deberían ser más efectivos contra las bacterias Gram-positivas debido a la interacción directa de la membrana celular con los componentes hidrófobos de los aceites esenciales y la presencia de lipoproteínas y lipopolisacáridos que forman una barrera para restringir la entrada de compuestos hidrófobos (Shelef, 1983; Sokovic, Glamočlija, Marin, Brkić, & Van Griensven, 2010). Por el contrario, según esta premisa, las bacterias Gram-negativas deberían ser más resistentes a los aceites esenciales de las plantas porque poseen una pared celular hidrófila (Kim *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros resultados mostraron un mayor diámetro de inhibición en bacterias Gram-negativas (*E. coli*) que en bacterias Gram-positivas (*L. plantarum* ES147, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. mesenteroides* MS1) para los aceites esenciales de pomelo y limón, mientras que el aceite esencial de naranja no logró inhibir a ningún tipo de bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), y el aceite esencial de mandarina inhibió actividad de manera moderada sobre ambos tipos de bacterias. Este fenómeno puede explicarse por la existencia de diferentes sitios celulares en bacterias que se unen específicamente con los diferentes compuestos de los aceites esenciales, lo cual provoca que las bacterias Gram-negativas sean más sensibles que las bacterias Gram-positivas (Klein, Rüben, & Upmann, 2013). Estos resultados concuerdan con Deans y Ritchie (1987), quienes concluyeron que las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas eran igualmente sensibles a los aceites esenciales cítricos, tanto para limón, mandarina y naranja.

Los aceites esenciales cítricos de diferentes orígenes mostraron diferentes grados de actividad antibacteriana contra todas las cepas analizadas (Tabla 5.02). El aceite esencial de pomelo de

origen estadounidense presentó una actividad estadísticamente mayor en todas las bacterias analizadas con respecto a los aceites provenientes del mismo cítrico, pero de otros orígenes. No se encontró inhibición contra ninguna de las bacterias analizadas para el aceite esencial de pomelo de origen comercial. El aceite esencial de limón de origen estadounidense presentó una actividad significativamente mayor que el de origen argentino o comercial frente a *L. mesenteroides* MS1. Además, no se encontró inhibición contra *L. plantarum* AATC 8014 y *E. coli* para el aceite esencial de limón de origen comercial. En el caso del aceite esencial de mandarina, los diferentes orígenes actuaron de manera distinta en cada bacteria probada; el aceite esencial de mandarina argentino presentó una zona de inhibición mayor en *L. plantarum* ES147 que la evidenciada por mandarina estadounidense. Sin embargo, esta última presentó estadísticamente la mayor zona de inhibición para *E. coli*, mientras que no se observaron diferencias entre los diferentes orígenes en *L. plantarum* ATCC 8014. La ubicación geográfica de cultivo, el tiempo de cosecha, el genotipo y las condiciones climáticas durante el crecimiento y la cosecha (Celiktaş *et al.*, 2007; Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007) pueden explicar estas diferencias y, por lo tanto, debe caracterizarse la composición y la actividad de los aceites esenciales obtenidos de plantas que crecen en diferentes lugares. Los aceites esenciales cítricos que mostraron la mejor actividad antimicrobiana en el ensayo de difusión en disco de papel fueron seleccionados para determinar la CIM y CBM utilizando el método de dilución en caldo frente a la bacteria patógena *E. coli*. El aceite esencial de pomelo de origen estadounidense y el aceite esencial de limón de orígenes argentino y estadounidense fueron analizados contra estas bacterias. Los valores de CIM oscilaron entre 0,33 y 0,55 mg/mL, y se encontraron valores de CBM entre 0,42 y 0,95 mg/mL. Entre ellos, el aceite de origen estadounidense presentó un CIM y un CBM más bajo que el de origen argentino. Los resultados de CIM y CBM para el aceite esencial de limón fueron de 0,55 mg/mL y 0,95 mg/mL para el tipo argentino y 0,33 mg/mL y 0,42 mg/mL para el tipo estadounidense, respectivamente. Por otro lado, el aceite esencial de pomelo de origen estadounidense presentó valores de CIM y CBM de 0,35 y 0,48 mg/mL, respectivamente. La fuerte actividad antibacteriana del aceite de pomelo mostrada en los diámetros de inhibición más altos (20 a 24 mm) fue confirmada por los valores más bajos de CIM y CBM observados contra *E. coli*.

## ANÁLISIS MULTIVARIADO

La Figura 5.07 representa los resultados obtenidos a partir de un gráfico biplot de los diferentes aceites esenciales cítricos estudiados en este trabajo, utilizando los ensayos de antioxidantes (ABTS, FRAP, DPPH, CUPRAC) y las actividades antimicrobianas (contra *L. bacillus* 8014, *L. plantarum* ES147, *Escherichia coli*, *L. mesenteroides* MS1) como variables de análisis. Se utilizaron dos dimensiones reducidas, representando el 71,8% de las muestras. Los PC1 y PC2 descritos son 45,3% y 26,5%, respectivamente. El 45,3% de la variabilidad de los aceites esenciales cítricos (PC1) se definió para el análisis antimicrobiano (*L. bacillus* ATCC 8014, *L. plantarum* ES 147, *E. coli* y *L. mesenteroides* MS1) y los ensayos de antioxidantes (ABTS, FRAP) puesto que son las variables con mayor proyección en el semieje positivo y negativo de PC1, respectivamente. Los pesos del análisis antimicrobiano fueron similares con una fuerte relación positiva entre ellos, lo que sugiere una contribución similar para cada aceite esencial cítrico. Los ensayos FRAP y ABTS se ubicaron en el semieje negativo de PC1, lo cual indica una correlación opuesta con las variables antimicrobianas. Esto ha sido asociado al hecho de que un valor positivo de PC1 indica un valor más bajo de limoneno, lo cual sugiere que limoneno es el responsable de la actividad antioxidante de los aceites esenciales cítricos. Desde la dispersión de datos, el aceite esencial de pomelo de origen estadounidense y el de limón de origen argentino y estadounidense están ubicados en el semieje positivo de PC1, indicando que son similares entre sí, pero son diferentes de los aceites esenciales cítricos ubicados en el semieje negativo de PC1. Se encuentra una fuerte asociación entre la actividad antimicrobiana y estos aceites esenciales cítricos, en concordancia con un valor de diámetro IZ grande (Tabla 5.02). La variabilidad del 26,5% de la muestra estuvo representada por los ensayos DPPH y CUPRAC. Estos ensayos mostraron una correlación muy débil con el resto de los ensayos de antioxidantes y no mostraron asociación con ninguna otra variable.



**Fig. 5.07.** Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) obtenido de los componentes principales primero (CP1) y segundo (CP2). Variables de la distancia euclidiana: ABTS, FRAP, DPPH y CUPRAC como ensayos de antioxidantes, y L147 (*Lactobacillus plantarum* ES147), L8014 (*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014), LEUCO (*Leuconostoc mesenteroides* MS1) y ECOLI (*Escherichia coli*). Tratamientos: cuatro aceites esenciales (pomelo, limón, mandarina, naranja) de tres orígenes diferentes: AR (Argentina), US (Estados Unidos) y CM (comercial).

### INHIBICIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este capítulo, donde el aceite esencial extraído de la cáscara de limón presentó poder inhibitorio y bactericida frente a *E. coli*, se propuso llevar a cabo la incorporación de este aceite esencial en películas a base de quitosano y evaluar su actividad antimicrobiana. Para ello, se desarrollaron diferentes formulaciones en donde se usó aceite esencial de limón como compuesto bioactivo y diferentes agentes plastificantes (sorbitol, glicerol y Tween 80) para la generación de la película de quitosano mediante casting. La tabla 5.03 muestra las diferentes formulaciones preparadas y el resultado respecto a apariencia y actividad antimicrobiana.



**Tabla 5.03.** Formulaciones a base de quitosano 1%P/P que se prepararon para probar su efectividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

Formulación	Aceite Esencial de Limón	Plastificante	APARIENCIA	Actividad contra <i>E. coli</i>
1	1%	Sorbitol 1%	Buena	No
2	1%	Sorbitol 3%	Buena	No
3	1%	Sorbitol 5%	Regular	No
4	3%	Sorbitol 1%	Buena	No
5	3%	Sorbitol 3%	Buena	No
6	3%	Sorbitol 5%	Regular	No
7	5%	Sorbitol 1%	Buena	No
8	5%	Sorbitol 3%	Buena	No
9	5%	Sorbitol 5%	Regular	No
10	1%	Glicerol 1%	Mala	No
11	1%	Glicerol 3%	Mala	No
12	3%	Glicerol 1%	Mala	No
13	3%	Glicerol 3%	Mala	No
14	5%	Glicerol 1%	Mala	No
15	5%	Glicerol 3%	Mala	No
16	1%	Tween 80 0.5%	Regular	No
17	1%	Tween 80 2%	Regular	No
18	3%	Tween 80 0.5%	Regular	No
19	3%	Tween 80 2%	Regular	No
20	5%	Tween 80 0.5%	Regular	No
21	5%	Tween 80 2%	Regular	Si
22	7%	Tween 80 0.5%	Regular	No
23	7%	Tween 80 2%	Regular	Si

Desde el punto de vista del aspecto de la película, la misma se logró a partir de formulaciones que contienen quitosano/aceite esencial de limón/sorbitol. Este tipo de película resultó ser estable en el tiempo, de buena apariencia y textura, y mantiene el aroma propio de la esencia de limón. En cuanto a actividad antimicrobiana, las formulaciones que contenían quitosano al 1% P/P, Tween 80 al 2% P/P y concentraciones de aceite esencial de limón al 5 y al 7% P/P, fueron las únicas capaces hasta el momento de desarrollar actividad antimicrobiana frente a *E. coli* (Figura 5.06). Este comportamiento diferenciado de los agentes plastificantes ha sido asociado al hecho de que Tween 80 actúa como detergente no iónico con capacidad de penetrar la membrana de las bacterias o como agente de compatibilización de los componentes de los aceites esenciales para su ingreso al interior del microorganismo.



**Fig. 5.08.** Imagen representativa de zona de inhibición de película a base de quitosano/aceite esencial de limón/Tween 80 contra *E. coli*.

## CONCLUSIONES

El presente estudio permitió evidenciar, mediante una selección de 4 aceites esenciales cítricos de 3 orígenes diferentes, que no se encontraron marcadas diferencias en el perfil químico de los aceites esenciales cítricos argentinos y estadounidenses, excepto en el caso del aceite esencial de mandarina, donde la diferencia del contenido de limoneno es marcada. Los aceites esenciales de limón mostraron una fuerte actividad antioxidante en términos de los ensayos DPPH y CUPRAC, que podrían usarse como un potencial conservante natural para

prevenir la oxidación de un alimento. Además, se determinó una actividad antibacteriana selectiva potencial de los aceites esenciales de pomelo y limón contra bacterias patógenas (*E. coli*) y bacterias beneficiosas (*L. plantarum* ATCC 8014 y *L. plantarum* ES147), y una actividad antibacteriana disminuida en bacterias benéficas que puede ser positiva, ya que bacterias como *L. plantarum* juegan un papel importante en nuestro cuerpo. Se observó un comportamiento diversificado entre los 4 aceites esenciales cítricos de los 3 orígenes. En general, los aceites comerciales no pudieron inhibir ninguna cepa de bacterias. Los aceites esenciales de especies de cítricos de Argentina pueden proporcionar bioactividades adicionales que pueden ser utilizadas por las industrias de fragancias cosméticas, nutracéuticas y farmacéuticas.



## CAPÍTULO 6: OTRAS PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

En los capítulos 2 y 3 se elaboraron películas a base de quitosano, con el agregado de ácido gálico y sorbitol. En este capítulo se modifica ese sistema, en un primer caso, manteniendo ácido gálico, pero cambiando el agente plastificante (Tween 80), y por el otro, manteniendo sorbitol, pero cambiando el compuesto bioactivo (ácido salicílico).

### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE MSR

El diseño experimental para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta de un modelo de dos factores. Este modelo matemático fue seleccionado para identificar la interacción entre las variables de respuesta estudiadas (TPC y DPPH) y las variables independientes. Los dos factores, es decir, las variables independientes utilizadas en la formulación de películas fueron la concentración de sorbitol y ácido gálico o Tween 80 y ácido gálico. El rango de estas variables se detalla en la Sección de Materiales y Métodos, que se basó en estudios previos de propiedades antioxidantes y solubilidades. El cálculo de las superficies de respuesta se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (v16.1, EE. UU.) y se estimó a partir de los datos experimentales con un intervalo de confianza del 95%.

Se analizó el ensayo de actividad antioxidante de películas de valores de TPC y DPPH. Las Tablas 6.01 y 6.02 muestran los datos de la capacidad antioxidante cuantificada para la película de quitosano/ácido salicílico/sorbitol y quitosano/ácido gálico/Tween 80. Las composiciones de las dos primeras columnas de las Tablas 1 y 2 representan el % P/P de los compuestos empleados en la mezcla de reacción. Las siguientes dos tablas son la concentración final de compuestos una vez que se evapora el solvente y se alcanza la película.

**Tabla 6.01.** Valores experimentales de capacidad antioxidante de diferentes composiciones de películas a base de quitosano/ácido salicílico/sorbitol.

Mezcla		Película		TPC <i>mg GA</i> <i>g film</i>	DPPH <i>μmol Tr</i> <i>g film</i>		
AS wt%	SB wt%	AS wt%	SB wt%				
0,00	1,00	0,00	41,35	1,7036	a	130,84	a
0,00	2,50	0,00	64,04	0,6734	b	n.d.	
0,00	5,00	0,00	78,39	0,7461	b	n.d.	
0,00	7,50	0,00	84,71	0,6009	b	n.d.	
0,00	10,00	0,00	88,27	0,1914	a	28	b
0,25	0,00	20,04	0,00	1,5518	a	57,64	b
0,25	1,00	12,88	36,07	1,1092	b	215,68	c
0,25	2,50	8,39	58,72	0,6217	b	80,9	c
0,25	5,00	5,31	74,27	0,8716	b	13,75	c
0,25	7,50	3,88	81,46	0,3698	a	n.d.	
0,25	10,00	3,06	85,60	0,4953	a	44,13	b
0,50	0,00	33,44	0,00	8,0329	b	335,87	c
0,50	1,00	22,85	31,99	3,1693	b	165,97	c
0,50	2,50	15,49	54,22	2,1527	b	144,34	c
0,50	5,00	10,08	70,56	1,007	c	37,64	b
0,50	7,50	7,47	78,45	0,2675	c	n.d.	
0,50	10,00	5,93	83,09	0,2641	d	n.d.	
0,75	0,00	43,04	0,00	8,3597	d	325,13	c
0,75	1,00	30,79	28,74	5,1569	d	208,54	c
0,75	2,50	21,58	50,36	4,7523	c	n.d.	
0,75	5,00	14,40	67,21	1,8357	c	55,41	b
0,75	7,50	10,81	75,65	0,9377	d	n.d.	
0,75	10,00	8,65	80,71	0,4952	d	75,02	c
1,00	0,00	50,25	0,00	7,1709	d	364,6	c
1,00	1,00	37,27	26,09	7,2504	c	229,01	d
1,00	2,50	26,86	47,01	7,0124	c	n.d.	
1,00	5,00	18,33	64,16	2,2054	d	124,31	e
1,00	7,50	13,91	73,04	0,9509	d	58,27	e
1,00	10,00	11,21	78,48	0,4292	d	48,47	e

Incertidumbres estandar:  $\mu(\text{AS or SB})=0,01$  wt%,  $\mu(\text{TPC})=0,44$  mg GA/g film,  $\mu(\text{DPPH})=34,1$   $\mu\text{mol Tr/g film}$ .

n.d.: no disponible

Valores seguidos por la misma letra en una misma columna implican diferencias no significativas ( $P < 0,05$ )

**Tabla 6.02.** Valores experimentales de capacidad antioxidante de diferentes composiciones de películas a base de quitosano/ácido gálico/Tween 80.

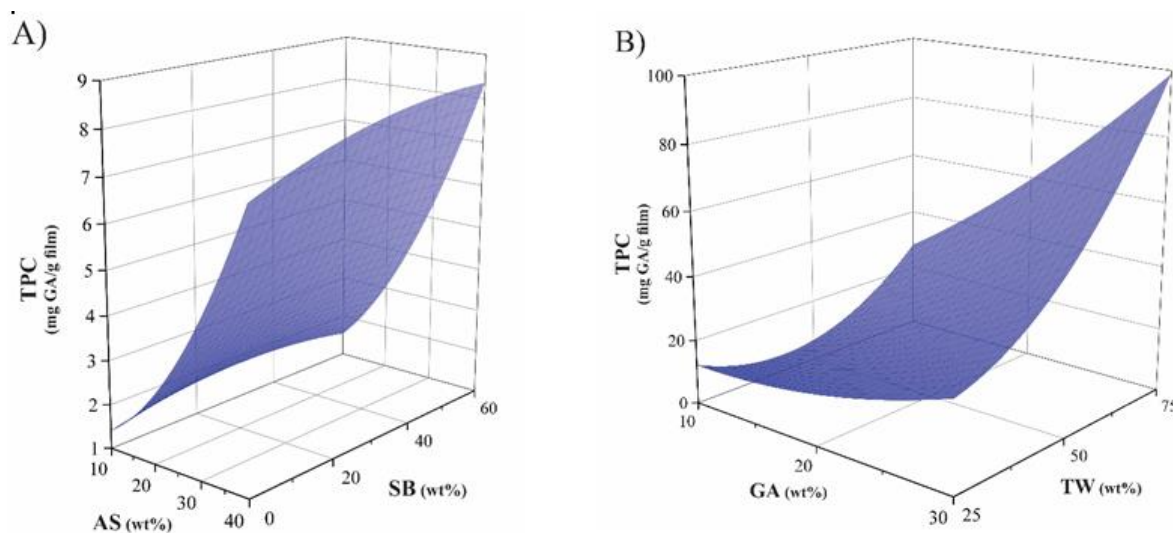
Mezcla		Película		TPC	DPPH	
GA wt%	TW wt%	GA wt%	TW wt%	$\frac{mg\ GA}{g\ film}$	$\frac{\mu mol\ Tr}{g\ film}$	
0,00	0,50	0,00	33,44	5,49	a	n.d.
0,00	1,00	0,00	50,25	1,00	b	25,04 a
0,25	0,50	14,35	28,69	10,84	c	159,05 b
0,25	1,00	11,17	44,69	9,51	d	426,29 b
0,50	0,50	25,13	25,13	32,41	c	263,76 b
0,50	1,00	20,12	40,24	7,42	d	229,37 b
0,50	3,00	11,20	67,19	11,99	e	445,35 c
0,75	1,00	27,45	36,60	33,42	f	246,51 b
0,75	3,00	15,92	63,66	39,04	g	450,24 c
1,00	1,00	33,56	33,56	37,04	f	274,83 b
1,00	3,00	20,16	60,48	36,25	g	379,56 c

Incertidumbres estandar:  $\mu(AS\ or\ SB)=0.01\ wt\%$ ,  $\mu(TPC)=1.21\ mg\ GA/g\ film$ ,  $\mu(DPPH)=26.6\ \mu mol\ Tr/g\ film$ .

n.d.: no disponible

Valores seguido por la misma letra en una misma columna implican diferencias no significativas ( $P < 0.05$ )

La Figura 6.01 muestra la superficie de respuesta de TPC para ambas formulaciones. Los valores (% P/P) corresponden a la concentración final de compuestos una vez que se evapora el solvente y se obtiene la película. Se encontraron resultados similares para los dos tipos de películas, donde un aumento en la cantidad de plastificante y del compuesto bioactivo determina un aumento en el valor de TPC. Esta tendencia es consistente con el hecho de que la película se construye en base a las interacciones puente hidrógeno entre pequeñas moléculas del plastificante y el compuesto bioactivo con la estructura de quitosano, formando una red reticulada tridimensional. Como se usa un mayor contenido de moléculas pequeñas (sorbitol o Tween 80) que contienen grupos hidroxilos en la formación de la película, una fracción dada de ellas participa de la reticulación de las cadenas de quitosano, mientras que la mayor parte de las moléculas restantes quedan ocluidas pero libres en la malla de la red formada .

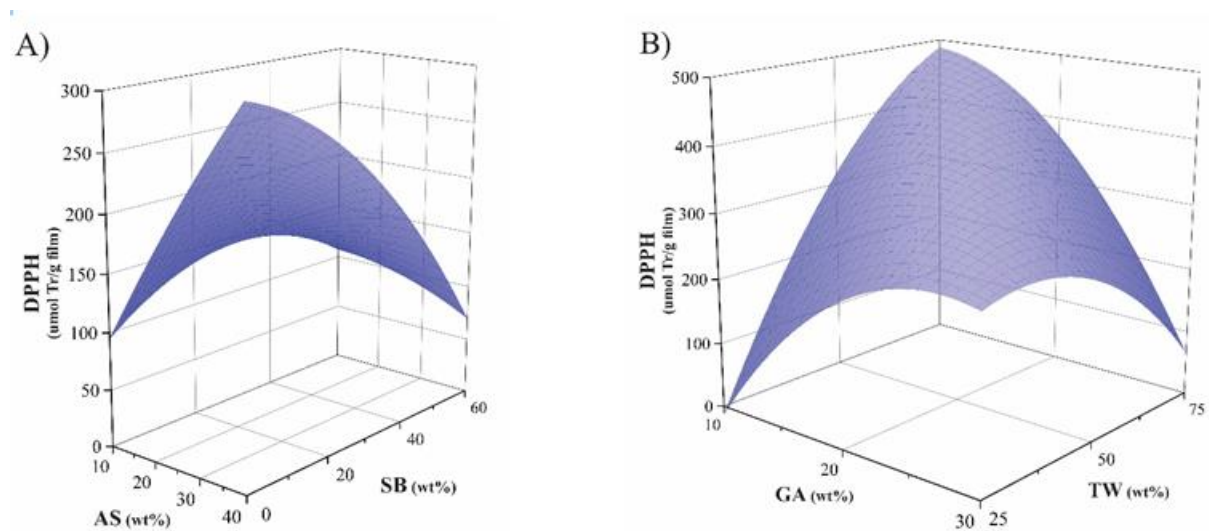


**Fig. 6.01.** Superficie de respuesta de TPC para películas de quitosano/ácido salicílico/sorbitol (A) y quitosano/ácido gálico/Tween 80 (B). Los valores (% en peso) corresponden a la concentración final de compuestos una vez que se evapora el solvente y se obtiene la película.

Por otro lado, la Figura 6.02 muestra la superficie de respuesta de DPPH expresada en TEAC en cada tipo de película. Para la película de quitosano/ácido salicílico/sorbitol, este parámetro tiene diferentes tendencias dependiendo del contenido de sorbitol evaluado. Cuando la concentración de sorbitol es nula, el valor TEAC aumenta con el aumento de la cantidad de compuesto bioactivo, mientras que el parámetro TEAC alcanza un valor máximo dentro del rango 0,10 – 35 % P/P de sorbitol. Para un contenido de sorbitol superior al 35% P/P el valor de TEAC disminuye a medida que se usa un contenido de ácido salicílico más alto en la formulación; este comportamiento se asocia a la interacción entre el agente plastificante y la molécula bioactiva a partir de la formación de enlaces de tipo puente hidrógeno. Estas estructuras complejas parecen disminuir la reactividad del agente reductor debido a su menor difusión, movilidad por el mayor tamaño obtenido, y también la disposición espacial hace que los grupos funcionales involucrados en la reacción redox no estén fácilmente disponibles. Se observa un fenómeno similar para las películas de quitosano/ácido gálico/Tween 80 donde para un 25% P/P de contenido de Tween 80 el parámetro TEAC aumenta con el aumento de la concentración de ácido gálico. Sin embargo, dentro del rango de Tween 80 entre 25 y cerca del 75% P/P, el parámetro TEAC alcanza un valor máximo centrado en una concentración de ácido gálico entre 10 y 30% P/P. Finalmente, para un 75% P/P de Tween 80 el valor de TEAC



disminuye para una mayor concentración de ácido gálico comportamiento que ha sido atribuido a la formación de estructura compleja entrecruzada mediante interacciones de puente hidrógeno entre ácido gálico y Tween 80, lo cual quita movilidad a la molécula activa.



**Fig. 6.02.** Superficies de respuesta de DPPH expresada por TEAC para películas de quitosano / ácido salicílico / sorbitol (A) y quitosano / ácido gálico / Tween 80 (B). Los valores (% en peso) corresponden a la concentración final de compuestos una vez que se evapora el solvente y se obtiene la película.

### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana de las películas obtenidas de ambas formulaciones se evaluó frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa), *Leuconostoc mesenteroides* MS1 (Gram-positiva) y *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014 (Gram-positiva).

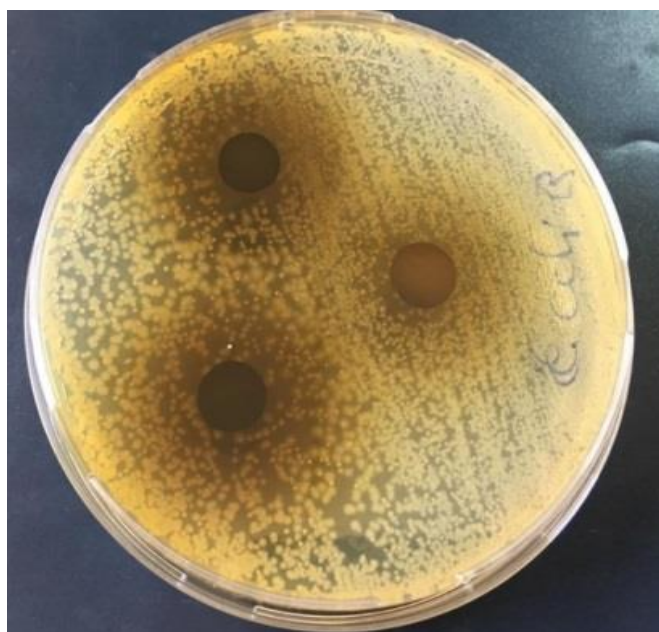
Considerando que las soluciones de ácido gálico ya habían demostrado actividad inhibidora frente a *Leuconostoc mesenteroides* MS1 (Serra *et al.*, 2018), se realizó la prueba con soluciones de ácido salicílico en condiciones similares, arrojando resultados negativos. Por otro lado, las soluciones de ácido gálico y las de ácido salicílico a diferentes concentraciones no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* ES147 y ATCC 8014, o de *Escherichia coli* ATCC 25922.

En este estudio, al evaluar la actividad antimicrobiana de las soluciones formadoras de película incrustadas sobre un soporte circular, los resultados muestran que no hay una zona de

inhibición definida en el medio sólido de agar para ninguna cepa de bacterias, independientemente del compuesto bioactivo y plastificantes utilizados, y tampoco para los controles de solución de quitosano, o de solución de quitosano más agente plastificante.

Por otro lado, las películas de quitosano puro, quitosano/sorbitol y quitosano/Tween 80 se evaluaron como control y no se encontró zona de inhibición en todas las cepas analizadas. Tampoco se registró inhibición frente a cualquier cepa analizada en la Formulación A. Sin embargo, no hubo crecimiento bacteriano debajo de la película, lo que indica que las películas en base a esta formulación pueden exhibir un efecto bacteriostático contra las cepas estudiadas, y que la difusión del agente activo se encuentra limitada por su estructuración en la malla de la película.

Para la Formulación B, se observaron los mismos resultados, excepto para *Escherichia coli*, ya que pudo observarse una notable disminución del número de bacterias, aunque sin lograr registrarse un halo de inhibición externo al disco claramente definido (Figura 6.03). Al parecer el mayor contenido de agente antibacteriano se encuentra contenido en el disco de la película, mientras que se observa un gradiente de concentración decreciente de este agente (libre) a medida que se aleja del disco.



**Fig. 6.03.** Disminución de la actividad microbiana de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a una película de quitosano, ácido gálico al 1% P/P y Tween 80 al 1% P/P.

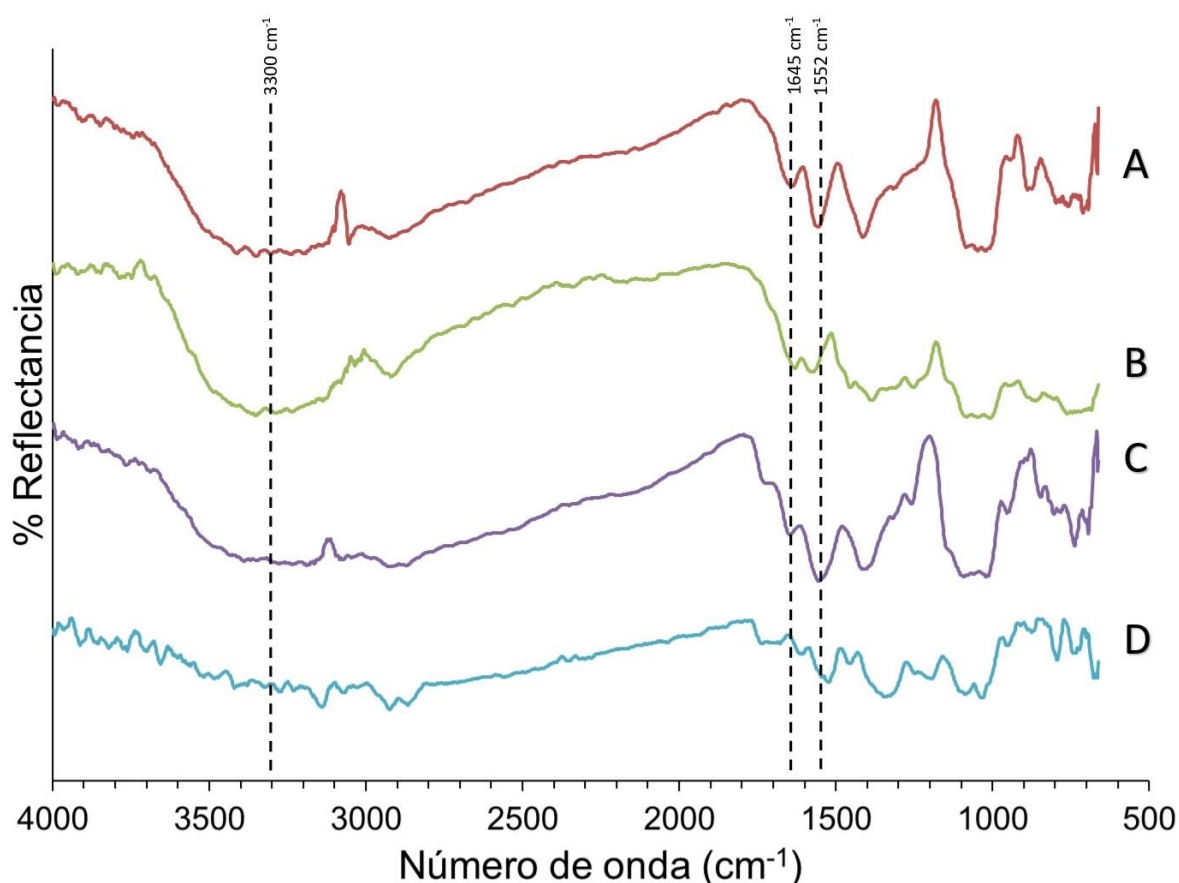
## INTERACCIÓN QUITOSANO-COMPUESTOS BIOACTIVOS

La espectrometría FTIR se utilizó para evaluar la modificación de la interacción de los esqueletos de quitosano después de la incorporación de ácido salicílico, ácido gálico, Tween 80 o sorbitol. La Figura 6.04 muestra los espectros FTIR de cuatro películas basadas en quitosano, la mezcla quitosano con 5% P/P de sorbitol (A), la mezcla quitosano, 5% P/P de sorbitol y 1% P/P de ácido salicílico (B), y la mezcla quitosano y 1% P/P de Tween 80 (C) o quitosano, 1% P/P de Tween 80 y 1% P/P de ácido gálico (D). El perfil de las curvas espectrales muestra señales características de grupos funcionales que pertenecen a los componentes de cada película. Se puede apreciar que tanto el plastificante sorbitol (A y B) como Tween 80 (C y D) modulan en cierto grado el perfil de las curvas espectrales correspondientes a las mezclas de quienes forman parte, diferenciando los perfiles entre los pares de mezclas citados. En ese sentido, las bandas características de quitosano y sorbitol, como son las vibraciones de estiramiento para O-H y N-H, se superponen dentro del rango de  $3550-3200\text{ cm}^{-1}$ , la tensión  $C_{sp^3}\text{-H}$  a  $2940\text{ cm}^{-1}$  y la vibración asociada C-OH ( $1100\text{ cm}^{-1}$ ) se muestran en la Figura 6.04. Además, se observó para el estiramiento C=O las señales a  $1640$  y  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la banda de amida y del grupo carboxilo de ácido salicílico, respectivamente, y la del grupo amino para la flexión de NH a  $1550\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a quitosano. En todos los casos, los mayores cambios en relación al espectro de la película de quitosano (Figura 3.05) se dan en las bandas de tensión de OH y NH, disminución de la señal de tensión de  $C_{sp^3}\text{-H}$ , y variación en intensidad y número de onda de la banda de C=O de amida, así como vibración de flexión N-H de amina (Figura 6.04, Tabla 6.03). Estas modificaciones en la curva espectral de las películas han sido asociadas a la formación de puentes hidrógenos con los diferentes grupos funcionales de los compuestos incorporados. Aquellas señales fueron fuertemente afectadas por la interacción con el compuesto activo y el plastificante en la mezcla. Además, el cambio más importante encontrado entre el espectro B en relación al A y se da con el incremento de la señal de C=O cerca de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , fenómeno que ha sido asociado al aumento del contenido de ácido salicílico. Más aún, el espectro FTIR de la película que contiene Tween 80 y ácido gálico muestra una disminución en la banda de estiramiento O-H cercano a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , y un importante desplazamiento de la señal de flexión N-H de  $1550$  a  $1530\text{ cm}^{-1}$  de C en relación a D, lo cual apoya la formación de puente hidrógeno entre los grupos hidroxilos de quitosano y aminos con los otros compuestos.

**Tabla 6.03.** FTIR - Bandas características de los grupos funcionales presentes en las películas

Película	Tensión C=O de amida ( $\text{cm}^{-1}$ )	Deformación N-H de amina ( $\text{cm}^{-1}$ )
A) Qs + SB	1645	1554
B) Qs + SB + SA	1637	1562
C) Qs + Tw + SA	1645	1552
D) Qs + Tw + SA	1680	1518
E) Qs	1640	1553

El pequeño tamaño de este tipo de componentes (plastificante y ácido salicílico) en relación a quitosano favorece su distribución en la totalidad de la masa líquida y la formación de puentes hidrógenos con grupos hidroxilos de las cadenas de quitosano. Por lo tanto, es de esperar que el compuesto activo y el plastificante jueguen un papel relevante en las propiedades finales de la película de quitosano obtenida a partir de estas interacciones no covalentes.



**Fig. 6.04.** Espectro FTIR de películas de quitosano con 5% P/P de sorbitol (A), mezcla quitosano, 5% P/P de sorbitol y 1% P/P de ácido salicílico (B), mezcla quitosano y 1% P/P de Tween 80 (C) o mezcla quitosano, 1% P/P de Tween 80 y 1% P/P de ácido gálico (D).

## CONCLUSIONES

Las películas a base de quitosano exhibieron una buena apariencia, en términos de homogeneidad, color y brillo. La investigación llevada a cabo ha permitido establecer ciertos parámetros para el desarrollo futuro de películas de quitosano que contienen estos compuestos bioactivos. Teniendo en cuenta la capacidad antioxidante evidenciada por las películas a base de quitosano, se espera que un mayor contenido de compuesto bioactivo y una baja concentración de plastificante conduzcan a la mejora de las propiedades finales. Sin embargo, hay dos cuestiones a considerar: una de ellas es la solubilidad máxima del compuesto bioactivo en la mezcla de reacción, y la segunda, la presencia de plastificante es esencial para mejorar la homogeneización de la mezcla de reacción y las propiedades mecánicas de las películas. Las películas obtenidas de una mezcla de reacción de quitosano/ácido gálico 1% P/P /Tween 80 con 1% P/P mostraron una notable disminución del número de bacterias en *Escherichia coli* ATCC 25922 aunque no se registró un halo de inhibición externo al disco claramente definido. Hasta ahora, los desarrollos estudiados han mostrado ser prometedores para lograr películas con propiedades deseables para una futura aplicación como material para el envasado de alimentos.



## CAPÍTULO 7: ESTUDIO DE APLICACIÓN DE PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO

En la búsqueda de encontrar una potencial aplicación para las películas sintetizadas a base de quitosano, como la de ser envases destinados a la conservación de alimentos, donde se realizaron diversos ensayos que no solamente se enfocan en la prolongación en la vida útil del alimento, sino también en la disposición final de dicho envase.

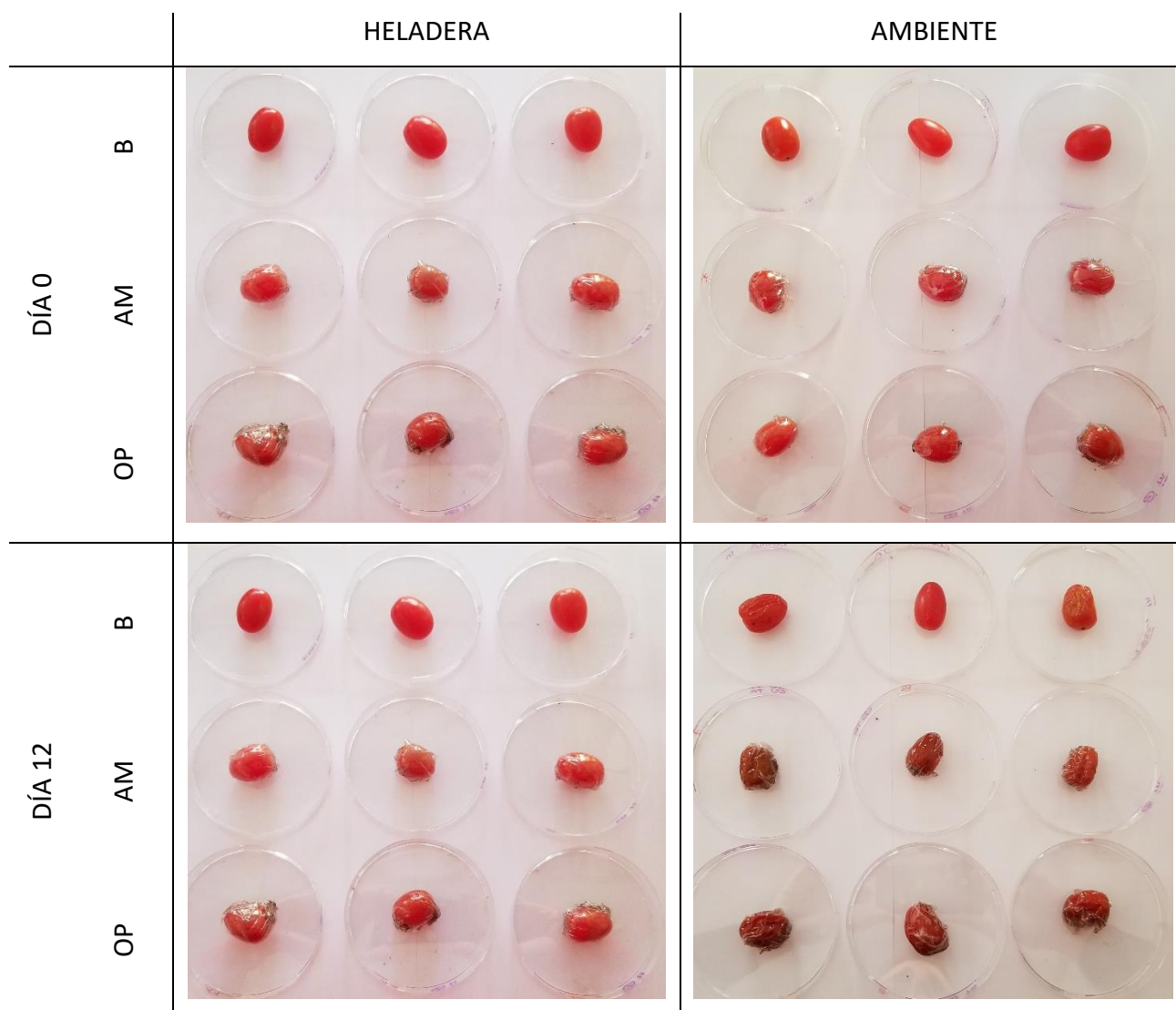
### CONSERVACIÓN DE TOMATES CHERRY

En los capítulos 3 y 4 se estudió la obtención de películas a base de quitosano, en donde primeramente se optimizaron las concentraciones de la sustancia bioactiva y el agente plastificante, y luego se optimizaron las condiciones de reacción con el objeto de alcanzar películas con el mejor desempeño frente a la actividad antioxidante y antimicrobiana, así como de las propiedades fisicoquímicas.

En ambos casos la formulación optimizada presenta una composición de quitosano al 1% p/p, con el agregado de ácido gálico al 1% p/p y sorbitol al 3.62% p/p. La película que se obtuvo a partir de condiciones de reacción normales (25 °C y 10 min. de agitación) se denominó “película ambiente” (AM), y aquella que se obtuvo bajo las condiciones de reacción optimizadas (60,7 °C y 50 min) se la nombró “película optimizada” (OP). Muestras por triplicado de estos dos tipos de películas fueron preparadas en moldes de 10 cm de diámetro, y las películas se obtuvieron por casting a temperatura ambiente.

Los tomates tipo cherry son frutos de gran consumo alrededor del mundo, y es uno de los que presenta mayores problemas de estabilidad luego de ser cosechado, como lo es el agrietamiento del fruto, la pudrición puntual o la presencia de “manchas amarillentas” que terminan en la descomposición de este. Frente a esta problemática, se postuló el uso de las películas obtenidas como recubrimiento de tomates de tipo cherry para evaluar el efecto de estos recubrimientos sobre el tiempo de descomposición de los tomates. Para llevar a cabo este estudio, se plantearon dos esquemas de trabajo: uno que fue llevado a cabo a temperatura ambiente, y otro bajo condiciones de temperatura controladas (heladera a 5 °C). Además de los tomates recubiertos por las películas AM y OP, se preparó para cada esquema

una muestra que fue tomada como blanco (B), la cual consistía en una muestra por triplicado de tomates tipo cherry sin ningún tipo de recubrimientos. Para asegurar la inocuidad del ensayo, previamente todos los tomates fueron lavados en una solución acuosa al 5 % P/V de hipoclorito de sodio. El recubrimiento fue llevado a cabo a partir del envoltorio de cada uno de los tomates con su película correspondiente, no siendo necesario ningún tipo de sellado, ya que fue suficiente por el contacto entre la misma película.



**Fig. 7.01.** Ensayo de conservación de tomates tipo cherry mediante recubrimiento con películas a base de quitosano.

La Figura 7.01 resume el esquema del ensayo y muestra el estado inicial y final de los tomates tipo cherry. Como es de esperar, luego de 12 días se puede observar que, tanto en los tomates



recubiertos con las películas como en los blancos del ensayo, que se conservaron mejor aquellos que estuvieron en la heladera; además de no evidenciarse ningún tipo de anomalía más allá de un simple achicharramiento, característico de este tipo de fruto durante una conservación prolongada, como se puede observar en la Fig. 7.02.



**Fig. 7.02.** Aspecto de tomate tipo cherry luego de conservación prolongada en heladera durante 12 días con envoltorio.

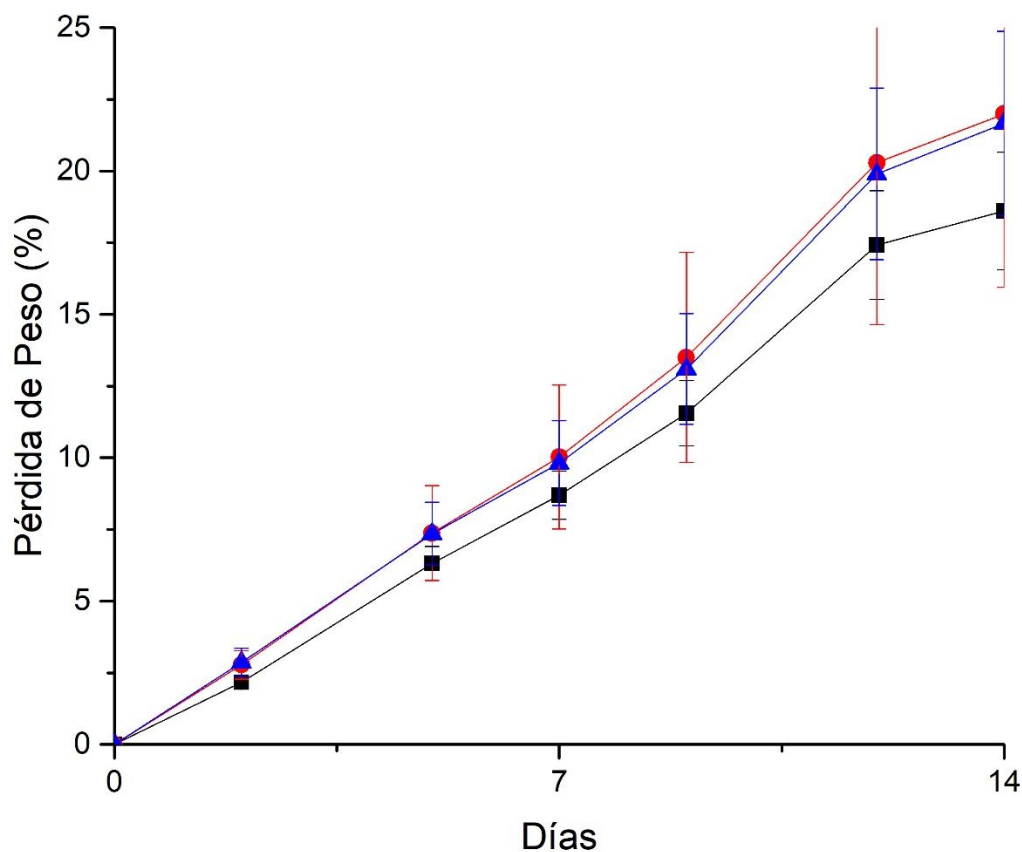
En lo que respecta al ensayo llevado a cabo a temperatura ambiente, se pudo determinar que en uno de los 3 tomates tipo cherry tomados como referencia, o sea, que no fue recubierto, se produjo un crecimiento microbiano no identificado, que no se observa sobre la superficie de ningún otro ejemplar del ensayo (Figura 7.03).



**Fig. 7.03.** Aspecto de tomate tipo cherry con crecimiento microbiano que no fue recubierto.

Se destaca que los ejemplares del fruto que fueron recubiertos, en todos los casos y frente a los dos tipos de ensayos, al final de este presentaron un pardeamiento de su coloración. Este

es un comportamiento esperado para este tipo de películas y se atribuye a la oxidación de ácido gálico presente en la película y que determina que con el paso del tiempo su color vire de transparente hacia una coloración marrón. Paralelamente, se analizó la pérdida de peso que sufrían los tomates tipo cherry a lo largo del tiempo. Para ello, se consideró el promedio de los pesos en cada una de las condiciones y bajo los distintos tratamientos.



**Fig. 7.04** Pérdida de peso de tomates tipo cherry a temperatura ambiente a lo largo del tiempo sin recubrimiento (■), recubierto con película ambiente (●), recubierto con película óptima (▲).

La Figura 7.04 muestra el desempeño de la cinética de pérdida de masa de los tomates a temperatura ambiente. El seguimiento de este parámetro hasta los 12 días no refleja diferencias significativas entre las muestras, lo cual refleja un adecuado desempeño por parte de la película, aunque después de este período los tomates recubiertos incrementan su cinética de pérdida de masa en relación con el tomate sin recubrimiento hasta alcanzar una diferencia del 10 % P/P a los 21 días. Muy probablemente se deba ajustar para este sistema

en particular la tasa de transferencia de humedad y la difusión de gases, factores que pueden alterar la cinética de la descomposición bioquímica del tomate, lo cual conduciría a una deshidratación más rápida del fruto (Figura 5.05). Además, no se descarta el hecho de que la película de quitosano esté actuando como barrera y absorbiendo el agua de este.



**Fig. 7.05.** Aspecto de tomate tipo cherry “deshidratado” por recubrimiento.

Queda como trabajo a futuro, la identificación del microorganismo que estaría atacando al fruto y que la película de quitosano estaría protegiendo.

## CONCLUSIONES

Los desarrollos de películas envoltorios para la conservación de alimentos presentados resultan prometedores para continuar trabajando en el futuro inmediato. En este caso, la utilización de envoltorios de películas a base de quitosano para recubrimiento de tomates tipo cherry, presentan dentro del tiempo vida útil de este tipo de tomate, un efecto protector frente a una cepa microbiana no conocida. Además de completar el estudio respecto de la conservación de tomates tipo cherry, se podría ampliar la metodología a otros frutos tales como frutillas o arándanos



## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES DE TRABAJO

La generación de películas a base de quitosano permite establecer potenciales desarrollos para la conservación de productos naturales. En este sentido, la utilización de la Metodología de Superficie de Respuesta resulta fundamental a la hora de predecir comportamientos deseados en las películas desarrolladas.

Primeramente, la metodología de superficie de respuesta permitió obtener las concentraciones óptimas de ácido gálico, como compuesto bioactivo, y de sorbitol, como plastificante, que deben ser agregadas a una solución de quitosano 1% P/P. Estas concentraciones resultaron del 1% P/P para ácido gálico y 3.62% P/P para sorbitol. Se optimizó de tal manera que las películas finales tengan buena capacidad antioxidante y propiedades mecánicas y físicas aptas para una futura aplicación como envase. Los resultados arrojan que el modelo predicho ajusta para la mayoría de las respuestas analizadas: TPC, DPPH, CUPRAC, EB, E, O y P. Para que el modelo funcione en TS y WVT se necesita aumentar el número de experimentos.

Conocida esa composición óptima, se planteó modificar las condiciones de reacción de las formulaciones. Nuevamente se utilizó la metodología RSM, y se encontró que las condiciones óptimas de reacción son a 60.7°C y 50 minutos de agitación constante. El modelo ajustó de manera moderada. De todos modos, quedó demostrado que la utilización de este tipo de metodología con soporte matemático bien puede aplicarse a desarrollos experimentales del tipo químico, combinando el poder de ambas ciencias.

Por otro lado, la utilización de desechos industriales para la obtención de aceites esenciales abre una ventana de aplicación que cumple con los estándares actuales del mundo acerca de condiciones de aprovechamiento de residuos y química verde. Se analizaron aceites esenciales de cítricos (Limón, Mandarina, Naranja, Pomelo) obtenidos de 3 orígenes diferentes (Argentina, Estados Unidos y Comercial). A grandes rasgos, no fueron halladas diferencias marcadas entre los perfiles químicos de los diferentes aceites, analizando los diferentes ensayos cromatográficos que se realizaron. Sin embargo, el estudio permitió determinar que los aceites esenciales de limón presentaban un gran poder bactericida contra *Escherichia coli*.

El reemplazo de sustancias puras por mezclas complejas, como los aceites esenciales, en la preparación de películas a base de quitosano es todo un desafío. Para ello, se probaron diferentes formulaciones, pero se encontró que películas a base de quitosano al 1% P/P, con 2% de Tween 80 y concentraciones de aceite esencial de limón al 5 y al 7% P/P inhiben exitosamente el desarrollo de *Escherichia coli*. Se deberá trabajar en disminuir esa concentración de aceite para que sea factible de un posible desarrollo tecnológico.

Se concluye que es viable la conservación de alimentos a partir de las películas desarrolladas a base de quitosano, con la incorporación de un compuesto puro tal como ácido gálico, o una sustancia compuesta como un aceite esencial, más el agregado de agentes plastificantes que confieran mejores propiedades mecánicas como lo son sorbitol o Tween 80. Estos desarrollos presentan resultados prometedores para la aplicación para envasado de alimentos.

A partir de las tendencias encontradas para las películas evaluadas, se plantea continuar con esta línea de trabajo en la mejora de los sistemas ya desarrollados, enfocando el estudio en el afinado de las condiciones de contorno fijadas en el modelo matemático de la Metodología de Superficie de Respuesta.

Por otra parte, es de interés estudiar el proceso de atomización (sprayado) de las mezclas de reacción formuladas para la formación de recubrimientos para la conservación de alimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, M., Sakamoto, H., Kawamura, R., Wang, W., Imai, K., & Shinomura, Y. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. *Histology and Histopathology*, 22, 437–442.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry* (4th ed.). Allured Publishing Corporation.
- Adukwu, E. C., Allen, S. C. H., & Phillips, C. A. (2012). The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x>
- Aissou, M., Chemat-Djenni, Z., Yara-Varón, E., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2017). Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds. *Comptes Rendus Chimie*, 20(4), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.018>
- Al-Holy, M. A., Al-Nabulsi, A., Osaili, T. M., Ayyash, M. M., & Shaker, R. R. (2012). Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control*, 23(1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.009>
- Allaf, T., Tomao, V., Besombes, C., & Chemat, F. (2013). Thermal and mechanical intensification of essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 72, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.06.005>
- Aloui, H., Khwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*, 170(2014), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.017>
- Ambrosio, C. M. S., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.045>
- Andrews, J. M. (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 1049–1049. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf083>
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J., & Halliwell, B. (1993). Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1880–1885. <https://doi.org/10.1021/jf00035a014>

- ASTM. (2012). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. West Conshohocken, PA: ASTM International. Retrieved from [www.astm.org](http://www.astm.org)
- ASTM. (2016). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. West Conshohocken, PA: ASTM International. Retrieved from [www.astm.org](http://www.astm.org)
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2016). Chitosan and Its Derivatives as Active Ingredients Against Plant Pests and Diseases. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*, 179–219. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00007-0>
- Bajpai, M., Pande, A., Tewari, S. K., & Prakash, D. (2005). Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4), 287–291. <https://doi.org/10.1080/09637480500146606>
- Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2019). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.10.113>
- Başer, K. ., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential oils: Science, Technology, and Applications. Handbook of Essential Oils - Science, Technology and Applications*. <https://doi.org/doi:10.1201/9781420063165-c3>
- Bellik, F.-Z., Benkaci-Ali, F., Alsafrá, Z., Eppe, G., Tata, S., Sabaou, N., & Zidani, R. (2019). Chemical composition, kinetic study and antimicrobial activity of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng extracted by conventional and microwave-assisted techniques using cryogenic grinding. *Industrial Crops and Products*, 139, 111505. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.111505>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bologna, J. L., Schaffer, J. V., & Cerroni, L. (2017). *Dermatology* (4th ed.). Elsevier Health.
- Bonfante-Alvarez, H., De Avila-Montiel, G., Herrera-Barros, A., Torrenegra-Alarcón, M., & González-Delgado, Á. D. (2018). Evaluation of five chitosan production routes with astaxanthin recovery from shrimp exoskeletons. *Chemical Engineering Transactions*, 70, 1969–1974. <https://doi.org/10.3303/CET1870329>
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M., & Wiles, J. L. (1996). Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage. *Journal of Food Science*, 61(5), 953–956. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10909.x>
- Calvo Martínez, J. A. (2014). Biotecnología: solución a la crisis que mejora resultados en pymes. Retrieved March 10, 2020, from [https://cincodias.elpais.com/cincodias/2014/10/03/pyme/1412326267\\_367083.html](https://cincodias.elpais.com/cincodias/2014/10/03/pyme/1412326267_367083.html)
- Celep, E., Akyüz, S., İnan, Y., & Yesilada, E. (2018). Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Industrial Crops and Products*, 118, 111–117. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.03.041>



- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, *100*(2), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.011>
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J. D., & Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, *100*(3), 1044–1048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.008>
- Chatterjee, S. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. *Oxidative Stress and Biomaterials*, 35–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>
- Cho, Y. S., Kim, S. K., Ahn, C. B., & Je, J. Y. (2011). Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. *Carbohydrate Polymers*, *83*(4), 1617–1622. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.019>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI Document M100-S23*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055835>
- Colobatiu, L., Gavan, A., Potarniche, A., Rus, V., Diaconeasa, Z., Mocan, A., ... Mihaiu, M. (2019). Evaluation of bioactive compounds-loaded chitosan films as a novel and potential diabetic wound dressing material. *Reactive and Functional Polymers*, 104369. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104369>
- Couto, A. G., Kassuya, C. A. L., Calixto, J. B., & Petrovick, P. R. (2013). Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *23*(1), 124–131. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000133>
- Czechowska-biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparaison of Methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, *17*, 5–20.
- Dai, H., Li, X., Du, J., Ma, L., Yu, Y., Zhou, H., ... Zhang, Y. (2020). Effect of interaction between sorbitol and gelatin on gelatin properties and its mechanism under different citric acid concentrations. *Food Hydrocolloids*, *101*, 105557. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.105557>
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, *5*(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- Doehlert, D. H. (1970). Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistical Society*, *19*(3), 231–239. <https://doi.org/10.2307/2346327>
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991). Use of chitosan coating to reduce water loss and mantain quality of cucumber and bell pepper fruits. *Journal of Food Processing and Preservation*, *15*(5), 359–368. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x>

- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33(4), 1819–1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Epure, V., Griffon, M., Pollet, E., & Avérous, L. (2011). Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.003>
- Fakhoury, F. M., Maria Martelli, S., Canhadas Bertan, L., Yamashita, F., Innocentini Mei, L. H., & Collares Queiroz, F. P. (2012). Edible films made from blends of manioc starch and gelatin - Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *LWT - Food Science and Technology*, 49(1), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.017>
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pérez-Alvarez, J. A., & Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.004>
- Finch, H. J. S., Samuel, A. M., & Lane, G. P. F. (2014). *Lockhart & Wiseman's Crop Husbandry Including Grassland*. (H. J. S. Finch, A. M. Samuel, & G. P. F. Lane, Eds.), *Lockhart & Wiseman's Crop Husbandry Including Grassland* (Ninth Edit). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232–1240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x>
- Fisher, Katie, & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>
- Frank, L. A., Onzi, G. R., Morawski, A. S., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Contri, R. V. (2020). Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 147, 104459. <https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2019.104459>
- Ghaouth, A. El, Ponnampalam, R., & Castaigne, F. (1992). Chitosan Coating to Extend the Storage Life of Tomatoes. *Hort Science*, 27(9), 1016–1018.
- Ghoorchibeigi, M., Larijani, K., Aberoomand, P., Zare, K., & Mehregan, I. (2016). Chemical composition and radical scavenging activity of citrusmedica peel essential oil. *Oriental Journal of Chemistry*, 8(4), 1929–1933. <https://doi.org/10.13005/ojc/330153>
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., ... Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245–262. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.036>

- Goff, H. D. (1997). Colloidal aspects of ice cream—A review. *International Dairy Journal*, 7(6–7), 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00040-X)
- González-Torralba, A., & Alós, J.-I. (2015). Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(3), 143–144. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2014.11.001>
- Guo, J. jing, Gao, Z. peng, Xia, J. lan, Ritenour, M. A., Li, G. yang, & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *Lwt*, 97(June), 825–839. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.060>
- Gupta, P., & Lakes, A. (2016). A Free Radical Primer. *Oxidative Stress and Biomaterials*, 1–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00001-2>
- Gutiérrez, C., Rodríguez, J. F., Gracia, I., De Lucas, A., & García, M. T. (2014). Preparation and characterization of polystyrene foams from limonene solutions. *Journal of Supercritical Fluids*, 88, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.002>
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J. C., Jiménez-Pérez, N. C., & Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.026>
- Haselton, A. T., Acevedo, A., Kuruvilla, J., Werner, E., Kiernan, J., & Dhar, P. (2015). Repellency of  $\alpha$ -pinene against the house fly, *Musca domestica*. *Phytochemistry*, 117, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.004>
- Ho, H. H., Chang, C. Sen, Ho, W. C., Liao, S. Y., Wu, C. H., & Wang, C. J. (2010). Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2508–2516. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.024>
- Hu, Y., Yu, Y., Zhang, Y., Yang, W., Li, T., Deng, R., & Jiang, M. (2017). Experimental measurements and equilibrium study of functional d-sorbitol in good and anti-solvent binary mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 238, 296–302. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2017.05.001>
- Iglesias, D. J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J. M., Naranjo, M. A., Ríos, G., Carrera, E., ... Talon, M. (2007). Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 333–362. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000400006>
- Ivanova, V., Dörnyei, Á., Márk, L., Vojnoski, B., Stafilov, T., Stefova, M., & Kilár, F. (2011). Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.039>
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., ... Zhou, Z. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3011–3033. <https://doi.org/10.1021/jf5006148>

- Kehrer, J. P., & Smith, C. V. (1994). Free Radicals in Biology: Sources, Reactivities, and Roles in the Etiology of Human Diseases. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, 25–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057168-3.50008-4>
- Kim, S. Y., Kang, D. H., Kim, J. K., Ha, Y. G., Hwang, J. Y., Kim, T., & Lee, S. H. (2011). Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science*, 76(1), 41–46. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01926.x>
- Klein, G., Rüben, C., & Upmann, M. (2013). Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*, 67(2), 200–208. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0354-1>
- Laohakunjit, N., & Noomhorm, A. (2004). Effect of Plasticizers on Mechanical and Barrier Properties of Rice Starch Film, 348–356. <https://doi.org/10.1002/star.200300249>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2020.01.006>
- Liu, H., Wang, C., Li, C., Qin, Y., Wang, Z., Yang, F., ... Wang, J. (2018). A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances*, 8(14), 7533–7549. <https://doi.org/10.1039/c7ra13510f>
- Liu, J., Liu, S., Chen, Y., Zhang, L., Kan, J., & Jin, C. (2017). Physical, mechanical and antioxidant properties of chitosan films grafted with different hydroxybenzoic acids. *Food Hydrocolloids*, 71, 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.019>
- Liu, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Yu, C., & Cao, S. (2013). Preparation and structural analysis of chitosan films with and without sorbitol. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.003>
- Liu, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Yu, C., & Cao, S. (2014). Physicochemical, mechanical and thermal properties of chitosan films with and without sorbitol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.039>
- Liu, Y., Carver, J. A., Calabrese, A. N., & Pukala, T. L. (2014). Gallic acid interacts with  $\alpha$ -synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(9), 1481–1485. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2014.04.013>
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. (2006). Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48(4), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.010>
- Luciardi, M. C., Blázquez, M. A., Cartagena, E., Bardón, A., & Arena, M. E. (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.056>

- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., & Jeong, K. C. (2017). Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate Polymers*, 176, 257–265. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.082>
- Marko, M. D., Gross, E. M., Newman, R. M., & Gleason, F. K. (2008). Chemical profile of the North American native *Myriophyllum sibiricum* compared to the invasive *M. spicatum*. *Aquatic Botany*, 88(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/J.AQUABOT.2007.08.007>
- Marques, C., Tarek, R., Sara, M., & Brar, S. K. (2016). Sorbitol Production From Biomass and Its Global Market. *Platform Chemical Biorefinery*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802980-0.00012-2>
- Melito, S., Petretto, G. L., Podani, J., Foddai, M., Maldini, M., Chessa, M., & Pintore, G. (2016). Altitude and climate influence *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum* essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 80, 242–250. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.11.014>
- Meng, H.-C., Wang, S., Li, Y., Kuang, Y.-Y., & Ma, C.-M. (2013). Chemical constituents and pharmacologic actions of *Cynomorium* plants. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(4), 321–329. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60049-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60049-7)
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523–530.
- Miller, N., Reicks, M., Redden, J. P., Mann, T., Mykerezzi, E., & Vickers, Z. (2015). Increasing portion sizes of fruits and vegetables in an elementary school lunch program can increase fruit and vegetable consumption. *Appetite*, 91, 426–430. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2015.04.081>
- Miranda-Castro, S. P. (2016). *Application of Chitosan in Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables*. *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00003-3>
- Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. M. (2015). Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.011>
- Mohsin, M., Hossin, A., & Haik, Y. (2011). Thermomechanical properties of poly(vinyl alcohol) plasticized with varying ratios of sorbitol. *Materials Science and Engineering A*, 528(3), 925–930. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2010.09.100>
- Moreno, G. M., & Alarcón, A. (2010). Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(5), 749–755. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70596-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70596-4)
- Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., ... Barba, A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food Chemistry*, 180, 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.01.141>

- Negm, N. A., Hefni, H. H. H., Abd-Elaal, A. A. A., Badr, E. A., & Abou Kana, M. T. H. (2020). Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 681–702. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.196>
- Nyström, C., & Westerberg, M. (1986). The use of ordered mixtures for improving the dissolution rate of low solubility compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 38(3), 161–165. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb04537.x>
- Ooi, Z. X., Ismail, H., Bakar, A. A., & Aziz, N. A. A. (2012). The Comparison Effect of Sorbitol and Glycerol as Plasticizing Agents on the Properties of Biodegradable Polyvinyl Alcohol/Rambutan Skin Waste Flour Blends. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 51(4), 432–437. <https://doi.org/10.1080/03602559.2011.639827>
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food Control*, 18(5), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
- Park, S. Il, & Zhao, Y. (2004). Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/jf034612p>
- Paula, H. C. B., De Paula, R. C. M., & Bezerra, S. K. F. (2006). Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(1), 395–400. <https://doi.org/10.1002/app.24009>
- Pavinatto, A., Victoria, A., Mattos, D. A., & Sanfelice, R. C. (2019). Coating with chitosan-based edible films for mechanical/ biological protection of strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.076>
- Peng, C., Chan, C. K., & Chow, A. H. L. (2001). Hygroscopic study of glucose, citric acid, and sorbitol using an electrodynamic balance: Comparison with UNIFAC predictions. *Aerosol Science and Technology*, 35(3), 753–758. <https://doi.org/10.1080/02786820152546798>
- Pengelly, A. (2004). *The Constituents of Medicinal Plants* (2nd ed.). Sydney: Allen & Unwin.
- Pereda, M., Moreira, M., Roura, S., Marcovich, N., & Aranguren, M. (2014). Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. *Ciencia e Investigación*, 64(2), 35–50.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Premkumar, T., Kim, D., Lee, K., & Geckeler, K. E. (2007). Polysorbate 80 as a tool: Synthesis of gold nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications*, 28(7), 888–893. <https://doi.org/10.1002/marc.200600858>

- Punithavathi, V. R., Prince, P. S. M., Kumar, R., & Selvakumari, J. (2011). Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, *650*(1), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.059>
- Randazzo, W., Jiménez-Belenguer, A., Settanni, L., Perdones, A., Moschetti, M., Palazzolo, E., ... Moschetti, G. (2016). Antilisterial effect of citrus essential oils and their performance in edible film formulations. *Food Control*, *59*, 750–758. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.057>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Revenga Frauca, J. (2011). Con las manos en la mesa. Un repaso a los crecientes casos de “infortunación” alimentaria. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, *15*(4), 207–208. [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(11\)70063-1](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(11)70063-1)
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, *31*(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Sader, H. S., Rhomberg, P. R., Flamm, R. K., & Jones, R. N. (2012). Use of a surfactant (polysorbate 80) to improve MIC susceptibility testing results for polymyxin B and colistin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *74*(4), 412–414. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.025>
- Sadiki, F. Z., Idrissi, M. El, Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., Hritcu, L., & Postu, P. A. (2019). Tetraclinis articulata essential oil mitigates cognitive deficits and brain oxidative stress in an Alzheimer’s disease amyloidosis model. *Phytomedicine*, *56*, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.PHYMED.2018.10.032>
- Salvucci, E., LeBlanc, J. G., & Pérez, G. (2016). Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Science and Technology*, *70*, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.043>
- Sánchez-gonzález, L., Chiralt, A., González-martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan, *105*, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.028>
- Sathiyabama, M., & Manikandan, A. (2016). Chitosan nanoparticle induced defense responses in finger millet plants against blast disease caused by *Pyricularia grisea* (Cke.) Sacc. *Carbohydrate Polymers*, *154*, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.CARBPOL.2016.06.089>
- Schiller, R. N., Barrager, E., & Schauss, A. G. (2001). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study Examining the Effects of a Rapidly Soluble Chitosan Dietary Supplement on Weight Loss and Body Composition in Overweight and Mildly Obese Individuals. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, *4*(1), 42–49.

- Schimites, P. I., Segat, H. J., Teixeira, L. G., Martins, L. R., Mangini, L. T., Baccin, P. S., ... Soares, A. V. (2020). Gallic acid prevents ketamine-induced oxidative damages in brain regions and liver of rats. *Neuroscience Letters*, *714*, 134560. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2019.134560>
- Serra, M., Garnero, J., Nicolau, V., & Andreatta, A. E. (2018). Assessment of natural vegetal extracts in the inhibition of *Leuconostoc mesenteroides* MS1. *Agriscientia*, *35*, 51–62. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v1.n35.20454>
- Shao, X., Cao, B., Xu, F., Xie, S., Yu, D., & Wang, H. (2015). Effect of postharvest application of chitosan combined with clove oil against citrus green mold. *Postharvest Biology and Technology*, *99*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.014>
- Shelef, L. (1983). The disintegration of beryllium by protons. *Journal of Food Safety*, *6*(3), 29–44. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.51.182>
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, *24*(8), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.003>
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, *27*(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.011>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, *15*(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Soleimani Aghdam, M., Asghari, M., Babalar, M., & Askari Sarcheshmeh, M. A. (2016). Impact of salicylic acid on postharvest physiology of fruits and vegetables. *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*, 243–268. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804313-4.00008-6>
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L., Pires, J. R. A., Rodrigues, P. F., Lopes, A. A. S., & Fernandes, F. M. B. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, *107*(May), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>
- Stanely Mainzen Prince, P., Priscilla, H., & Devika, P. T. (2009). Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, *615*(1–3), 139–143. <https://doi.org/10.1016/J.EJP.2009.05.003>
- Straccia, M. C., D'Ayala, G. G., Romano, I., Oliva, A., & Laurienzo, P. (2015). Alginate hydrogels coated with chitosan for wound dressing. *Marine Drugs*, *13*(5), 2890–2908. <https://doi.org/10.3390/md13052890>
- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients, *18*, 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00045-6)



- Sun, X., Wang, Z., Kadouh, H., & Zhou, K. (2014). The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.037>
- Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., & Hoseini, S. M. (2016). Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio* - Comparison with eugenol. *Aquaculture*, 464, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.028>
- Tao, N. G., Liu, Y. J., F, T. Y., H, Z. J., L, Z. M., & Y, Z. H. (2009). Essential oil composition and antimicrobial activity of fruits of *Iryanthera ulei* W. from Colombia. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(3), 437–438. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072009000400008>
- Taylor, P., Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. (2003). Critical Reviews in Food Science and Nutrition Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61–87.
- Tomadoni, B., Ponce, A., Pereda, M., & Ansorena, M. R. (2019). Vanillin as a natural cross-linking agent in chitosan-based films : Optimizing formulation by response surface methodology. *Polymer Testing*, 78(June), 105935. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.105935>
- Trujillo, F. J., & Geveke, D. J. (2014). Nonthermal Processing By Radio Frequency Electric Fields. *Emerging Technologies for Food Processing*, 259–269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00014-0>
- Tseliou, M., Pirintsos, S. A., Lionis, C., Castanas, E., & Sourvinos, G. (2019). Antiviral effect of an essential oil combination derived from three aromatic plants (*Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. f., *Origanum dictamnus* L. and *Salvia fruticosa* Mill.) against viruses causing infections of the upper respiratory tract. *Journal of Herbal Medicine*, 17–18, 100288. <https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2019.100288>
- USDA Foreign Agricultural Service. (2018). *Citrus: World Markets and Trade*. Retrieved from <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- Vaičiulytė, V., Ložienė, K., Taraškevičius, R., & Butkienė, R. (2017). Variation of essential oil composition of *Thymus pulegioides* in relation to soil chemistry. *Industrial Crops and Products*, 95, 422–433. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.10.052>
- Valmórbida, J. L., & Vitolo, M. R. (2014). Factors associated with low consumption of fruits and vegetables by preschoolers of low socio-economic level. *Jornal de Pediatria*, 90(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/J.JPED.2014.02.002>
- Van Den Broek, L. A. M., Knoop, R. J. I., Kappen, F. H. J., & Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 116, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>

- Vanti, G. L., Masaphy, S., Kurjogi, M., Chakrasali, S., & Nargund, V. B. (2019). Synthesis and application of chitosan-copper nanoparticles on damping off causing plant pathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.179>
- Verberne, M. C., Budi Muljono, R. A., & Verpoorte, R. (1999). Salicylic Acid Biosynthesis. In P. J. J. Hooykaas, M. A. Hall, & K. R. Libbenga (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones* (Vol. 13, pp. 295–312). Elsevier Science B.V.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antibacterial activity of lemon (citrus lemon l.), mandarin (citrus reticulata l.), grapefruit (citrus paradisi l.) and orange (citrus sinensis l.) essential oils. *Journal of Food Safety*, 28(2008), 567–576.
- Wang, H., Qian, J., & Ding, F. (2017). Emerging Chitosan-Based Films for Food Packaging Applications. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04528>
- Wang, L., Guo, H., Wang, J., Jiang, G., Du, F., & Liu, X. (2019). Effect of Herba Lophatheri extract on the physicochemical properties and biological activities of chitosan film. *International Journal of Biological Macromolecules*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.067>
- Williams-Ashman, H. G. (1965). d-Sorbitol. *Methods of Enzymatic Analysis*, 167–170.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50033-5>
- Xie, M., Hu, B., Wang, Y., & Zeng, X. (2014). Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(37), 9128–9136. <https://doi.org/10.1021/jf503207s>
- Xie, M., Hu, B., Yan, Y., Zhou, L., Ou, S., & Zeng, X. (2016). Rheological properties of gallic acid-grafted-chitosans with different substitution degrees. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.018>
- Yadav, S., Mehrotra, G. K., Bhartiya, P., Singh, A., & Dutta, P. K. (2020). Preparation, physicochemical and biological evaluation of quercetin based chitosan-gelatin film for food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 227(September 2019), 115348.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115348>
- Yang, D. J., Moh, S. H., Son, D. H., You, S., Kinyua, A. W., Ko, C. M., ... Kim, K. W. (2016). Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. *Molecules*, 21(7), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules21070899>
- Yang, K., Dang, H., Liu, L., Hu, X., Li, X., Ma, Z., ... Ren, T. (2019). Effect of syringic acid incorporation on the physical , mechanical , structural and antibacterial properties of chitosan film for quail eggs preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 876–884. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.045>
- Yeamsuksawat, T., & Liang, J. (2019). Characterization and release kinetic of crosslinked chitosan film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol. *Food Packaging and Shelf Life*, 22(October), 100415. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100415>

- Yen, M. T., Yang, J. H., & Mau, J. L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 840–844. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.003>
- Zarei, S., Abdolrahimi, S., & Pazuki, G. (2019). Thermophysical characterization of sorbitol and 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 497, 140–150. <https://doi.org/10.1016/J.FLUID.2019.06.006>
- Zeng, D., & Luo, X. (2012). Physiological Effects of Chitosan Coating on Wheat Growth and Activities of Protective Enzyme with Drought Tolerance. *Open Journal of Soil Science*, 02(03), 282–288. <https://doi.org/10.4236/ojss.2012.23034>
- Zhang, H., Zhai, Y., Wang, J., & Zhai, G. (2016). New progress and prospects : The application of nanogel in drug delivery. *Materials Science & Engineering C*, 60, 560–568. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.041>
- Zhang, Y., Zhang, M., & Yang, H. (2015). Postharvest chitosan-g-salicylic acid application alleviates chilling injury and preserves cucumber fruit quality during cold storage. *Food Chemistry*, 174(September), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.106>
- Zhang, Z. H., Han, Z., Zeng, X. A., Xiong, X. Y., & Liu, Y. J. (2015). Enhancing mechanical properties of chitosan films via modification with vanillin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.042>
- Ziani, K., Ursúa, B., & Maté, J. I. (2010). Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Protection*, 29(8), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.03.002>

