

Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero

Nathalia Valderrama Bohórquez ¹, Néstor Ariel Algecira Enciso ²
William Albaracín Hernández ³

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - Universidad Nacional de Colombia- 111321, Bogotá D.C., Colombia
e-mail: nvalderramab@unal.edu.co

² Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, 111321, Bogotá D.C., Colombia e-mail: nalgecirae@unal.edu.co

³ Facultad de Ingeniería Agroindustrial, 520010, Universidad de Nariño, Pasto, Nariño, Colombia
e-mail: walbarracinh@udenar.edu.co

RESUMEN

Se estudió el efecto de factores como humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con y sin inclusión de aceites. Se incluyeron aceites de tomillo (TEO) y de romero (REO) en proporciones de 0,5:1 y 1:1 v/p (EOs: CH), así como su combinación 50:50 (TEO:REO). Las películas formadas se almacenaron a temperaturas de 5, 20, 33°C y humedades relativas de 60 y 93% durante cuatro semanas. Las condiciones de almacenamiento alteraron las propiedades mecánicas y físicas de las películas, tales como humedad y capacidad de retención de agua debido a la hidrofobicidad del polímero, al efecto plastificante de las moléculas de agua y a fenómenos de retrogradación influenciados por la temperatura y el tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: Quitosano, polímeros, películas modificadas, aditivos alimentarios.

ABSTRACT

The effect of factors of humidity, temperature and time on the physical properties of chitosan films with and without the thyme and rosemary essential oils inclusion was studied. The thyme (TEO) and rosemary (REO) essential oils were included in 0.5:1 and 1:1 v/w (EOs:CH), as well as their combination 50:50 (TEO:REO). The films were stored at temperatures of 5, 20, 33°C and relative humidities of 60 and 93% during four weeks. Storage conditions modify the physical properties of the films due to their hydrophilic behavior, the plasticizing effect of the water molecules and the retrogradation phenomena influenced by storage temperature and time.

Keywords: Chitosan, polymers, modified films, food additives.

1. INTRODUCTION

El quitosano (CH) (poli-(1,4)-2-amino-2-desoxi-PD-glucosa) se obtiene a partir del proceso de desacetilación de la quitina (poli-(1,4)-2-acetamida-2-PD-desoxi-glucosa) por métodos enzimáticos o químicos.

Los recientes avances en envases y empaques se han enfocado en el estudio de la inclusión de diferentes compuestos químicos para mejorar las propiedades de las películas de CH [1-4]. Los aceites esenciales han sustituido a los antioxidantes sintéticos [5]. Estos han sido incluidos en matrices poliméricas de CH para mejorar sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Los principales componentes del aceite esencial de romero son eucaliptol (39,6%), alcanfor (19%), α -pineno (4,8%), timol (52,9%) y p-cimeno (34%), mientras que los principales componentes del aceite esencial de tomillo son timol (52,9%) y p-cimeno (34%) [6]. Estos componentes pueden inhibir el crecimiento de microorganismos.

Por otra parte, al ser el quitosano un polímero que interactúa con el medio circundante, diferentes factores, tales como humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento, pueden modificar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas de quitosano [7]. Estos cambios se presentan debido a fenómenos como la recristalización del CH, la pérdida de humedad, la disminución de la concentración del plastificante,

la lenta reacetilación de los grupos amino, los cambios de volumen libre, entre otros [8-10]. Las propiedades de deformación-fuerza de las películas disminuyen con el aumento del tiempo de almacenamiento [9, 11]. Sin embargo, la temperatura y la humedad ejercen una mayor influencia en las propiedades mecánicas [10, 12]. Por otra parte, las propiedades de color y de permeabilidad al oxígeno de las películas no cambian a menos que se almacenan por debajo de 0°C [11].

Las propiedades físicas de las películas antes mencionadas, influyen en la afectividad de la aplicación de estos empaques en el campo de los alimentos y por consiguiente la calidad del alimento almacenado. Las propiedades mecánicas aseguran la integridad y la conservación de los empaques, mientras que las propiedades tales como la humedad, la resistencia al agua, la permeabilidad al vapor de agua y la capacidad de hinchamiento son importantes porque determinan la protección que se le brinda al alimento mientras que este está en contacto con el agua, así como la calidad del envase o empaque cuando se aplica en alimentos con una alta actividad de agua.

El objetivo de este artículo es determinar el efecto de factores como humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con y sin inclusión de aceites esenciales.

2. MATERIALES Y METODOS

Preparación de las películas. El quitosano marca Kitoflokk™, grado de desacetilación medio (80%) y bajo peso molecular (viscosidad de 13 cP) fue donado por Norwegian Chitosan, Aspertunet, Norway. La disolución de CH (2% p/v) se preparó disolviendo el polímero en soluciones acuosas de ácido láctico a una concentración final de 1% v/v utilizando un Ultra-Turrax®. Esta solución se filtró posteriormente a temperatura ambiente para eliminar las impurezas a través de un filtro cualitativo marca BOECO® (Boeckel Co, Hamburgo, Alemania) y se esterilizó a 100°C durante 15 min.

Las disoluciones se mezclaron con polisorbato 80 (4% p/p) y glicerol (16% p/p) a concentraciones basadas en el peso de quitosano en solución. Los aceites esenciales de tomillo (TEO) y romero (REO) se incluyeron en proporciones de 0,5:1 y 1:1 v/p (EOs: CH), así como su combinación 50:50 (TEO:REO). Las disoluciones formadoras de películas se homogeneizaron a 30.000 rpm durante 5 minutos usando un Ultra-Turrax® y se desgasificaron en una cámara de vacío a 25°C.

Todas las películas se prepararon con 10 g de solución asegurando una cantidad de 1,27 mg de quitosano por cm². Las películas de control se prepararon de igual forma pero sin la adición de aceites esenciales (EOs). Seguidamente se secaron a 30°C durante 65 horas y las películas obtenidas se analizaron inmediatamente después del secado.

Determinación de las propiedades físicas de las películas de quitosano

Espesor. El espesor se determinó usando un micrómetro digital con una precisión de 0,001 mm (Coolant Proof Micrometer 293, Mitutoyo Measuring Instruments, Kanagawa, Japan). Los valores se calcularon como el promedio de al menos 10 mediciones en lugares al azar de cada película.

Máximo esfuerzo de tensión y porcentaje de elongación. El equipo TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Ltd. Hamilton, MA) fue utilizado para medir el máximo esfuerzo de tensión (TS) y el porcentaje de elongación (%E). Las muestras se cortaron y se midió el espesor de película según la ASTM D 882-01. El TS (n = 10), este se calculó dividiendo la carga máxima (máximo esfuerzo registrado) por el área de la sección transversal. El %E (n = 10) se calculó dividiendo la distancia de elongación en el momento del rompimiento por la longitud inicial de la muestra y multiplicando por 100.

Máximo fuerza de punción y deformación por punción. La máxima fuerza de punción (PS) y la deformación por punción (PD) se midieron por triplicado usando un equipo TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Ltd. Hamilton, MA). Las películas se cortaron en cuadrados de 2 cm. Un punzón cilíndrico de 2 mm de diámetro pasó a través de cada película a una velocidad constante (1 mm/s). Se registraron los valores de máxima fuerza en el punto de punción. Los valores de PS fueron divididos por el espesor de las películas con el fin de corregir el efecto de la variación de espesor. La PD de las películas se calculó usando la diferencia de distancia recorrida del punzón durante el momento del contacto con la película y el momento en que se registró el rompimiento.

Contenido de humedad. El contenido de humedad de las películas (n = 3) se determinó midiendo la pérdida de peso después del secado en un horno a 110°C hasta que la muestra seca alcanzó un peso constante.

Capacidad de retención de agua. Las películas cortadas en círculos de 2 centímetros de diámetro (n= 3) se pesaron y posteriormente se sumergieron en agua durante 10 minutos. Seguidamente, se eliminó el

exceso de agua en la superficie de las películas con papel filtro y se pesó cada muestra. La capacidad de retención de agua (SI) se calculó de acuerdo a CAO, *et al.* [13].

Permeabilidad al vapor de agua. Esta propiedad se determinó de acuerdo al método descrito por MEI, *et al.* [14], con algunas modificaciones. Las películas de quitosano fueron acondicionadas durante 72 horas a 25°C y 75% de humedad relativa antes de la determinación. Las películas de quitosano fueron montadas en copas de permeación herméticamente selladas que contenían cloruro de calcio anhidro granular. Las copas permitían un área de permeación de las películas de 0,00312 m², estas se colocaron en una cámara de vidrio y se almacenaron a 25°C y 75% de humedad relativa. Los pesos fueron registrados en intervalos de 24 horas. La ganancia de peso se empleó para calcular la permeabilidad al vapor de agua (WPA) de las películas. Se calculó y se expresó en (g⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹). Todas las pruebas se llevaron a cabo por duplicado.

Determinación del efecto antimicrobiano. Se determinó el efecto de la inclusión de aceites esenciales en las películas de quitosano que no fueron almacenadas, mediante una prueba de difusión en agar para las cepas de *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aerus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Las películas (n = 3) se cortaron en discos de 1 cm de diámetro con una cuchilla circular. El número inicial de UFC estaba entre 105-106, las cuales fueron cultivadas en agar Mueller-Hinton. Las cepas bacterianas se incubaron a 37°C durante 48 horas. La oxitetraciclina fue el antibiótico de control. La técnica fue descrita por HOSSEINI, *et al.* [15].

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las películas de quitosano fueron montadas en soportes de aluminio y se les aplicó un baño de oro usando el equipo BAL-TEC SDC-050 (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein). Todos los especímenes se examinaron con un microscopio electrónico de barrido FEI QUANTA 200 (FEI, Hillsboro, Oregón) bajo condiciones de bajo vacío (2 x 10⁻² torr). Las muestras fueron fotografiadas en diferentes ángulos de inclinación para obtener imágenes de la sección transversal.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Esta prueba se llevó a cabo usando un equipo DSC 2910 modulado (TA Instruments, New Castle, DE) empleando una atmósfera de nitrógeno. El rango de la temperatura utilizado fue de -40 a 200°C. La velocidad de calentamiento/enfriamiento fue configurada en 10°C/min.

Almacenamiento. Las películas control y con la inclusión de aceites esenciales fueron almacenadas a 5, 20, 33°C y a humedades relativas de 60 y 93%. Las propiedades físicas fueron medidas después de 2 y 4 semanas de almacenamiento. Los parámetros de almacenamiento fueron escogidos en base a estudios publicados por otros autores

Análisis estadístico. Se empleó un análisis multifactorial (p<0,05) usando el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies Inc, Warrenton, Virginia, USA).

3. RESULTADOS

Efecto de la adición de los aceites esenciales en las propiedades físicas de las películas de quitosano

Espesores. Se presentan en la Figura 1. El rango varió entre 0,063 a 0,104 mm. El espesor de la película fue afectado por su composición. La inclusión de aceites esenciales disminuyó significativamente el espesor.

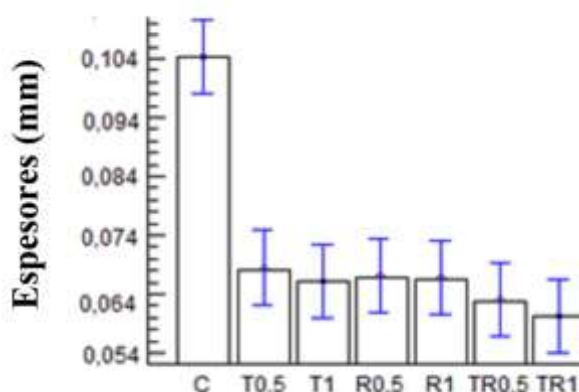


Figura 1: Espesores de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Máximo esfuerzo de tensión y porcentaje de elongación. La inclusión de EOs no afecta significativamente la resistencia a la tensión ni el porcentaje de elongación. Sin embargo, estas variables respuesta presentaron diferentes tendencias. Se reportaron valores menores de la TS cuando se incrementó la concentración de REO, mientras que las películas con la concentración más alta de la combinación TEO:REO reportaron valores significativamente mayores de TS comparados con las películas con inclusión de REO (Figura 2). Adicionalmente, se presentaron diferencias significativas en el %E de las películas con la inclusión de TEO a la concentración más baja y la inclusión de REO a la concentración más alta. Los resultados sugieren que la inclusión de REO redujo la capacidad de elongación de la película debido al registro de menores valores %E y de TS cuando se comparó con la capacidad de elongación de las películas con inclusión de TEO y de la combinación TEO:REO (Figura 3).

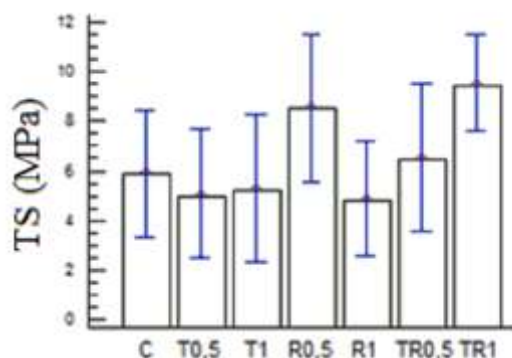


Figura 2: Máximo esfuerzo de tensión de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

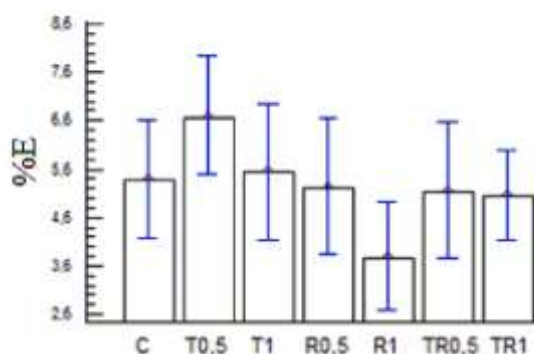


Figura 3: Porcentaje de elongación de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Máxima fuerza de punción (PS) y deformación por punción (PD). Estas propiedades mecánicas comprueban la integridad de los empaques bajo la acción de la penetración, lo cual se relaciona e influye en la capacidad de conservación de sus propiedades de barrera. La PS de las películas no fue significativamente diferente ($p > 0,05$). Sin embargo, la Figura 4 muestra que el valor de PD fue significativamente inferior para la muestra con la inclusión de 1:1 v/p (TEO:CH) que para la muestra control.

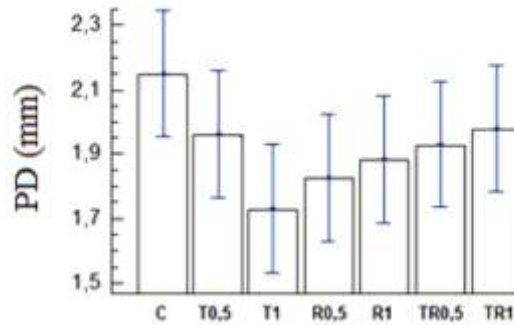


Figura 4: Deformación por punción de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Contenido de humedad. La inclusión de aceites esenciales de tomillo y de romero disminuyó significativamente el contenido de humedad de las películas de quitosano como se muestra en la Figura 5, lo cual se atribuyó a un aumento de la hidrofobicidad de las películas. Adicionalmente, cuando la concentración del aceite esencial de tomillo aumentó hasta 1:1 v/p (TEO:CH), el contenido de humedad de las películas disminuyó significativamente.

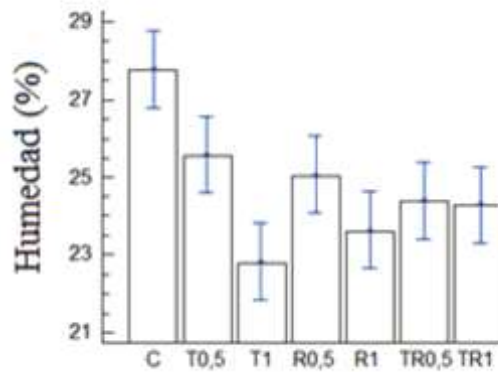


Figura 5: Contenido de humedad de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Resistencia al agua. Los resultados mostraron que la película de quitosano presenta una baja solubilidad en agua. Sin embargo, se observó un aumento significativo de la solubilidad cuando los EOs fueron incluidos en las películas de quitosano (Figura 6).

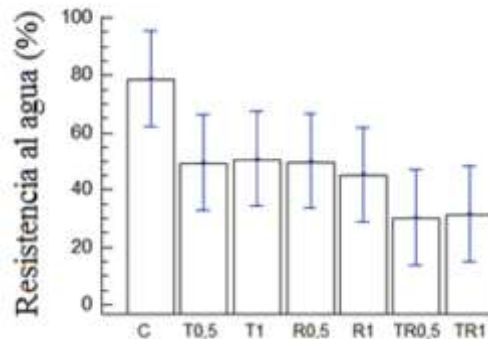


Figura 6: Resistencia al agua de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Capacidad de retención de agua. Esta propiedad predice la conservación de la calidad del empaque

durante el envasado y el almacenamiento de productos alimenticios [16]. En algunos casos, una capacidad de retención de agua mayor, puede ser deseable para absorber el exceso de agua en la superficie de los alimentos con alto contenido de humedad [17]. Durante los ensayos, no se observaron cambios significativos de SI debido a la inclusión de REO y de TEO en películas de quitosano (Figura 7).

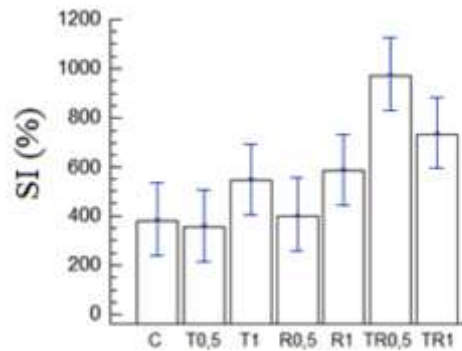


Figura 7: Capacidad de retención de agua de las películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Permeabilidad al vapor de agua (WVP). El efecto de la inclusión de aceites esenciales sobre la WVP de las películas de CH se presenta en la Figura 8. Se observa que la inclusión de TEO, REO y la combinación TEO:REO, afectó significativamente esta propiedad. Los resultados demostraron que la WVP de las películas de control fue de $7,5 \times 10^{-13} \text{ gm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$, valor que disminuyó significativamente cuando los aceites esenciales fueron incorporados en las películas de quitosano. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las WVP de las películas que contenían diferentes concentraciones de TEO, REO y sus combinaciones TEO:REO.

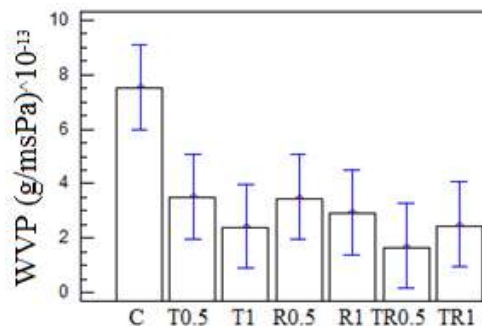


Figura 8: Permeabilidad al vapor de agua de películas de quitosano. Las diferencias estándar entre tratamientos se muestran gráficamente indicando las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

Propiedades antimicrobianas de las películas.

Se evaluó el efecto de la inclusión de EOs en películas de quitosano sobre la actividad antimicrobiana contra las cepas de *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aerus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Se observó un aumento del diámetro de inhibición con la inclusión de la mezcla de aceites esenciales de romero e tomillo, además que el efecto fue más eficaz para las cepas de *S. aureus*. Este fenómeno se presenta porque las combinaciones de TEO y REO presentan una actividad sinérgica en la película de quitosano [6], además que las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los agentes antimicrobianos [18].

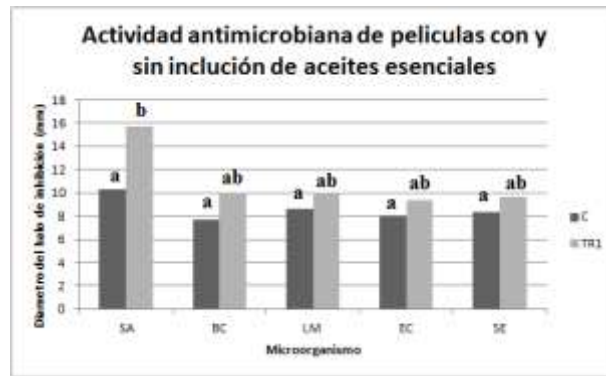


Figura 9: Efecto de la adición de aceites esenciales sobre las propiedades antimicrobianas de las películas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). La estructura interna de la películas de quitosano sin inclusión de aceites esenciales fue continua (Figura 10a), mientras que las películas de quitosano con inclusión de OEs no presentaron una estructura homogénea (Figuras 10b-g).

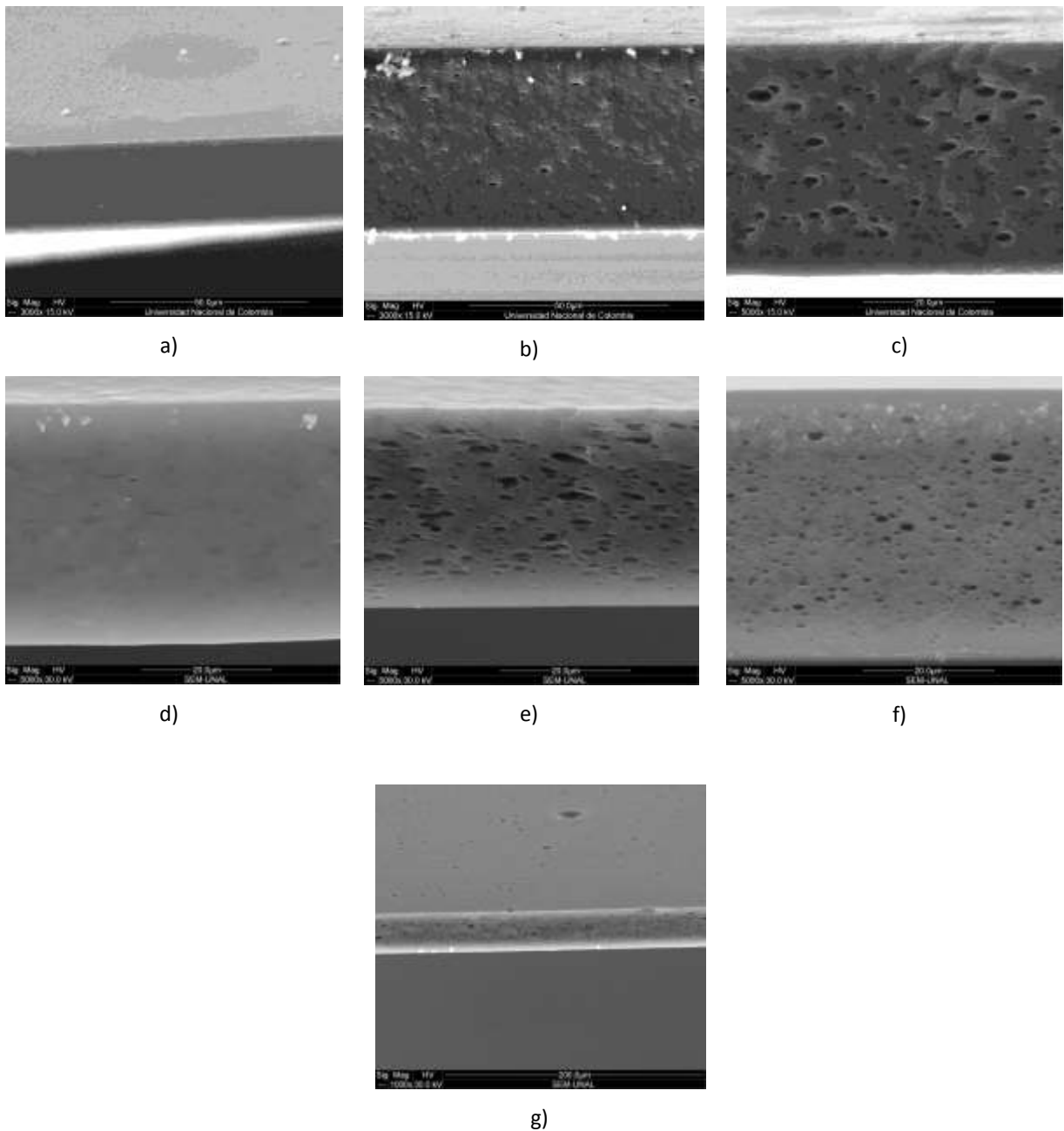


Figura 10: Micrografías de la sección transversal de las películas de quitosano por SEM. **a)** C (3000x); **b)** T0,5 (3000x); **c)** T1 (5000x); **d)** R0,5 (5000x); **e)** R1 (5000x), **f)** TR0,5 (5000x); **g)** TR1 (1000x).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las propiedades térmicas de las películas de quitosano fueron analizadas empleando el método de DSC en un rango de temperaturas entre -40 hasta 200 °C (Tabla 1). Los termogramas se presentaron en la Figura 11. La temperatura de transición vítrea (T_g) no demostró un comportamiento térmico estable. Sin embargo, los resultados presentaron un pico endotérmico centrado en las temperaturas entre 89 a 144 °C.

Tabla 1: Resultados DSC.

Materials	T_g (°C)	T_c (°C)
C	26,04	89,17
T0,5	42,56	130,55
T1	16,01	143,7
R0,5	32,38	94,78
R1	17,34	104,81
TR0,5	14,61	100,16
TR1	17,01	112,5

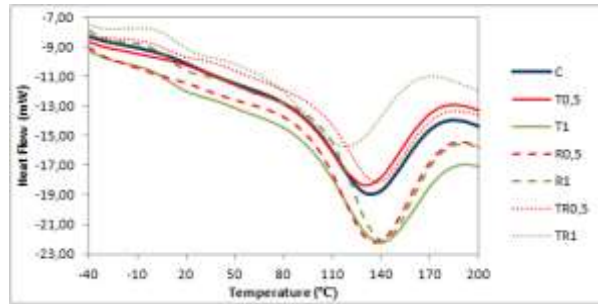


Figura 11: Termogramas de las películas obtenidos por DSC.

Efecto del almacenamiento en las propiedades físicas de las películas de quitosano

Espesor. El espesor no fue afectado por los cambios de humedad ni de temperatura. Sin embargo, la inclusión de aceites esenciales disminuyó las diferencias entre los espesores de las películas evaluadas durante el almacenamiento (Figura 12).

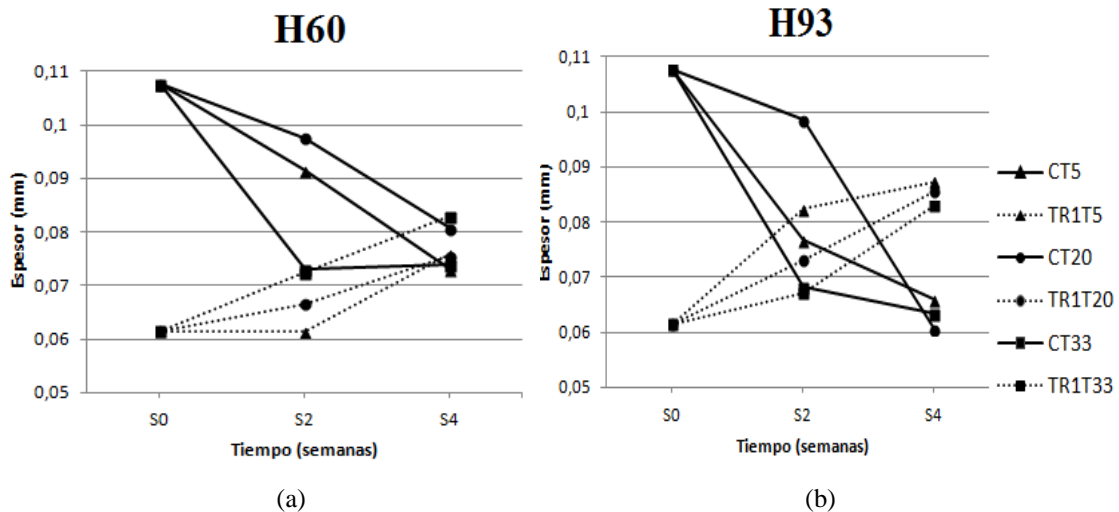


Figura 12: Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el espesor de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%.

C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

Contenido de humedad. Se registraron valores significativamente mayores en contenido de humedad cuando las películas fueron almacenadas a humedades altas como se muestra en la Figura 13.

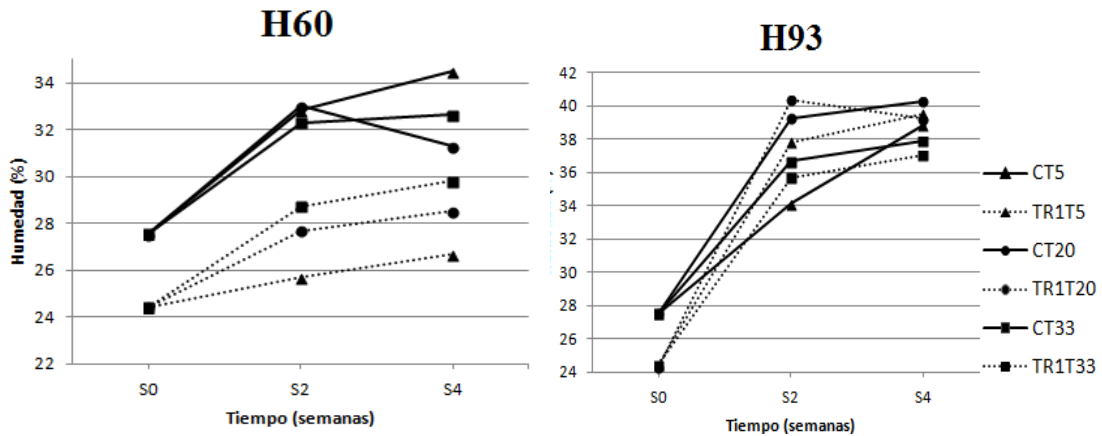


Figura 13: Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de humedad de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%. C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

Máximo esfuerzo de tensión y porcentaje de elongación. No se registraron diferencias significativas del máximo esfuerzo de tensión entre las películas evaluadas. Sin embargo, el porcentaje de elongación de las películas fue afectado por la humedad de almacenamiento como se observa en la Figura 14. Adicionalmente, las películas sin almacenamiento presentaron un porcentaje de elongación menor. Sin embargo, el tiempo de almacenamiento no evidenció un efecto significativo sobre esta propiedad.

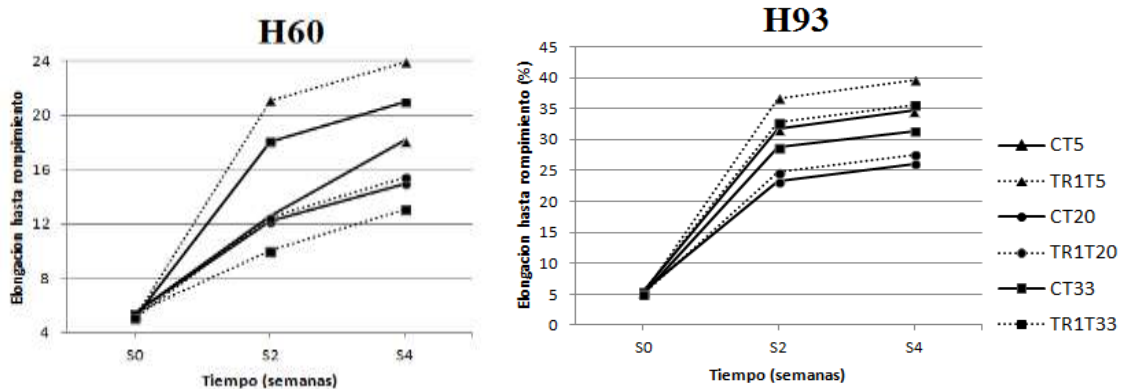


Figura 14. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el máximo esfuerzo de tensión de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%. C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

Máxima fuerza de punción y deformación por punción. Las condiciones de almacenamiento afectaron estas propiedades. Cuando el tiempo y la humedad aumentaron, la película de quitosano se tornó más frágil, registrando valores significativamente menores de resistencia a la punción y de deformación por punción (Figuras 15 y 16). Por otra parte, los resultados demostraron que el aumento de la temperatura produjo una disminución en los valores de deformación por punción.

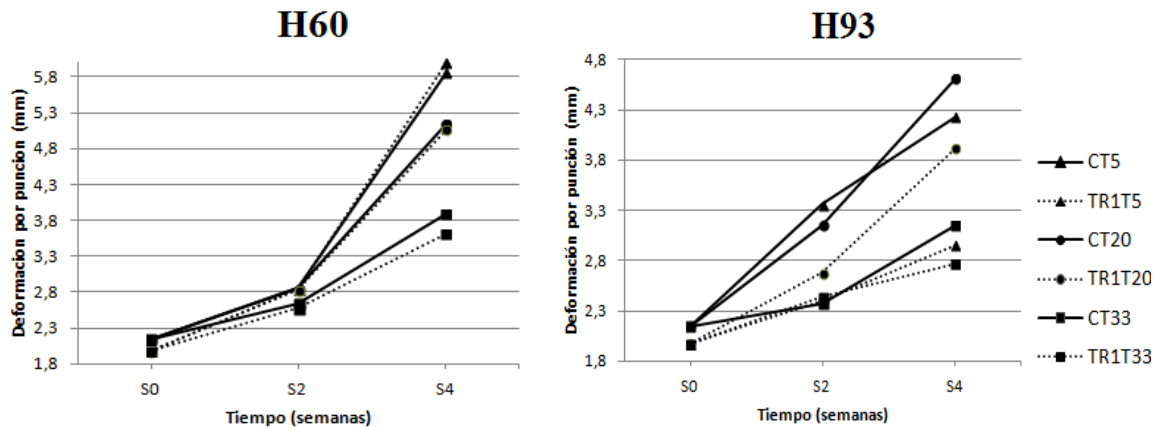


Figura 15: Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la deformación por punción de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%. C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

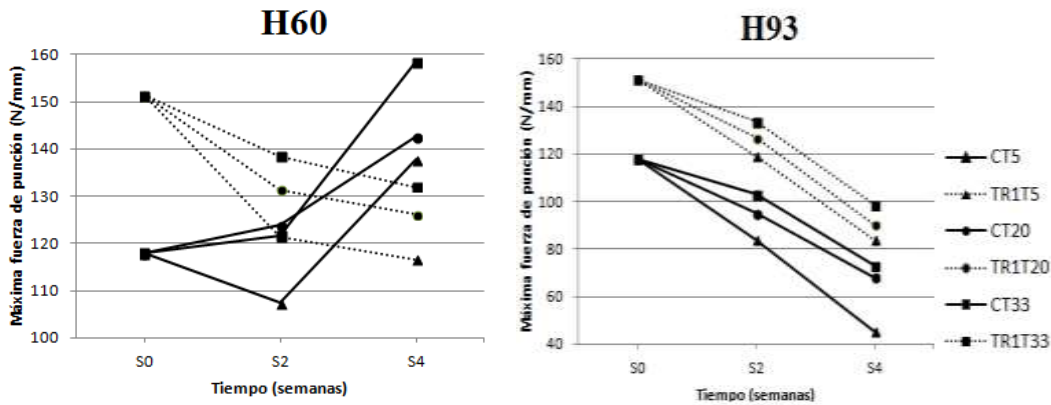


Figura 16: Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la deformación por punción de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%. C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

Capacidad de retención de agua. Los resultados indicaron que la capacidad de retención de agua disminuyó con el aumento de la humedad y del tiempo de almacenamiento (Figura 17). Sin embargo, la temperatura no ejerció un efecto significativo.

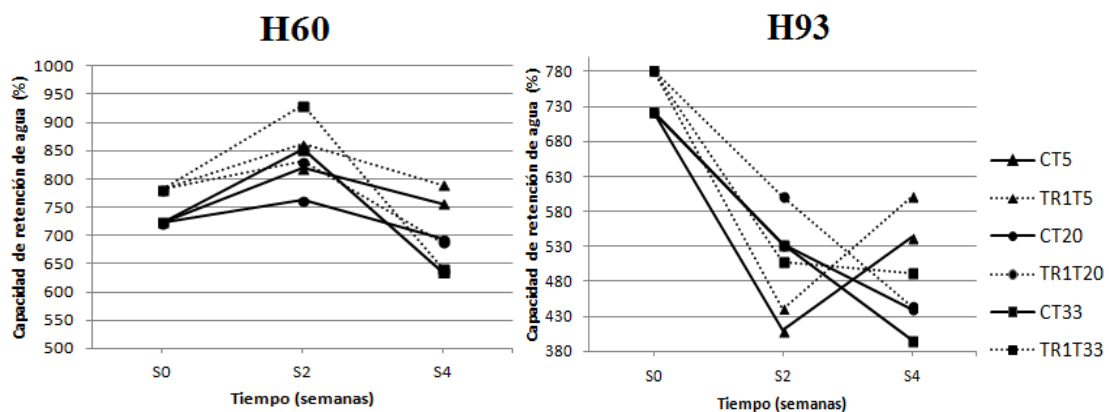


Figura 17: Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la capacidad de retención de agua de las películas: (a) Humedad relativa de almacenamiento 60%, (b) Humedad relativa de almacenamiento 93%. C: muestra control, TR1: mezcla de aceites esenciales de tomillo y romero proporción 1:1 en relación al quitosano, S: semana de almacenamiento, T: temperatura de almacenamiento, H: humedad de almacenamiento.

Microscopía electrónica de barrido. En las micrografías se observa que las condiciones de almacenamiento no modificaron notoriamente la superficie ni la estructura interna de las películas como se observa en las Figuras 18a-f.

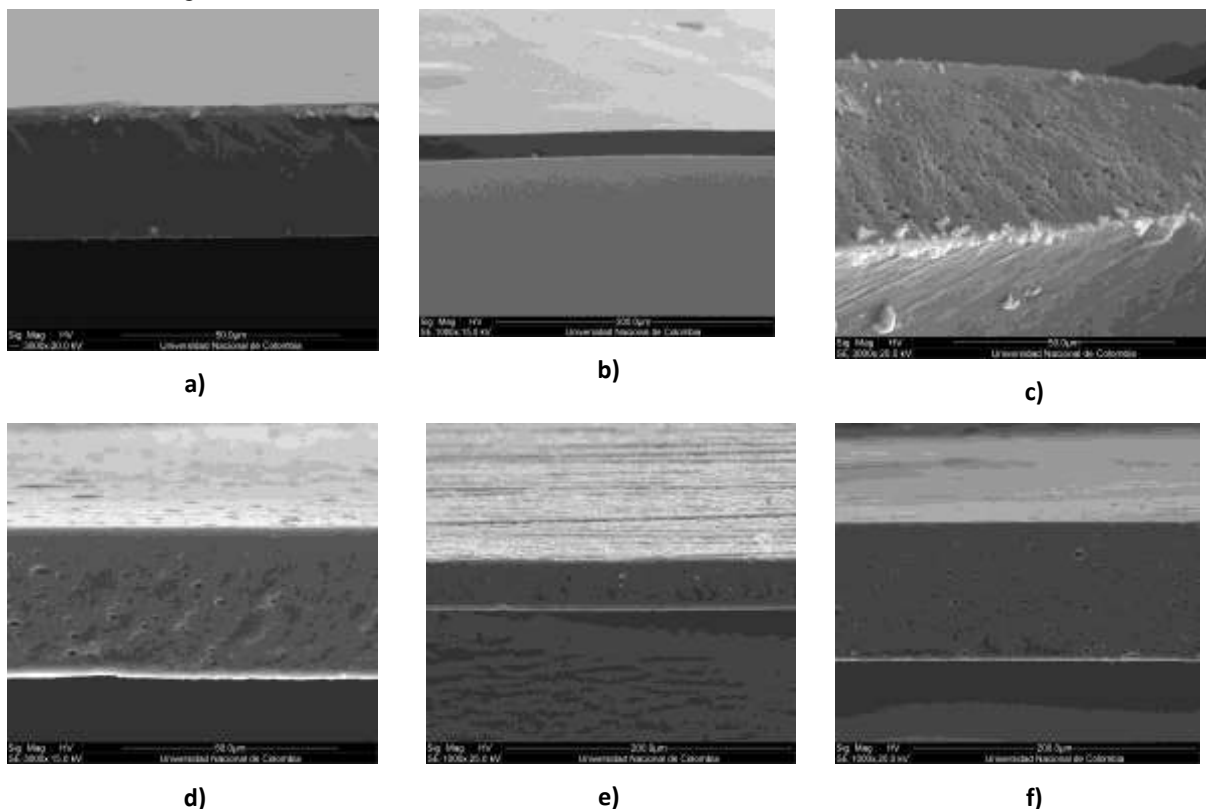


Figura 18: Micrografías de la sección transversal de las películas de quitosano almacenadas. a) C T5H93S2 (3000x); b) C T20H60S2 (1000x); c) TR1 T33H93S2 (3000x); d) TR1 T5H60S4 (3000x); e) TR1 T33H60S4 (1000x), f) TR1 T33H93S4 (1000x).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados no demostraron un efecto notorio de la temperatura y de la humedad de almacenamiento sobre la Tg. Sin embargo, las películas con inclusión de aceites esenciales registraron valores mayores incluso durante el almacenamiento (Tabla 2). Adicionalmente, las propiedades térmicas de las películas fueron modificadas, especialmente en las películas con la inclusión de los aceites esenciales (Figuras 19 y 20).

Tabla 2: Resultados del análisis de DSC para las películas almacenadas.

Condiciones de almacenamiento		Tg(°C)		Tc(°C)	
		Humedad			
		60	93	60	93
5	C	12,88	31,80	113,15	82,37
	TR1	33,95	49,35	105,09	96,97
20	C	10,38	14,51	106,42	99,13
	TR1	41,22	37,09	116,34	106,59
33	C	9,34	17,28	88,57	64,54
	TR1	8,49	33,96	110,42	84,36

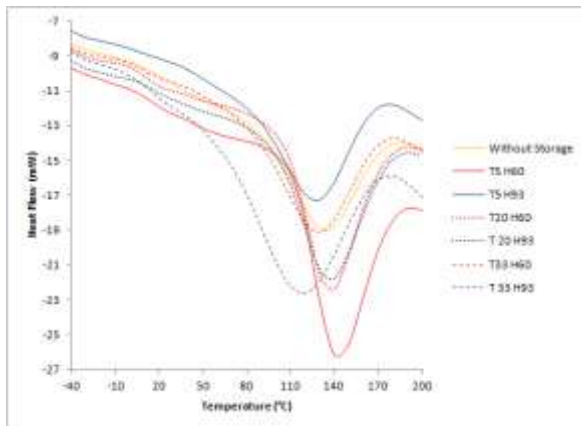


Figura 19: Termogramas de las películas control (C).

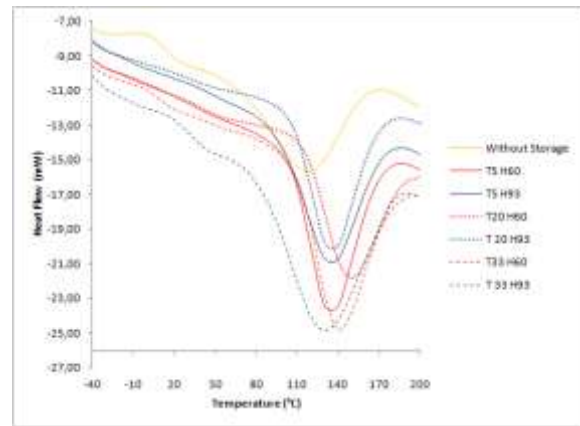


Figura 20: Termogramas de las películas con inclusión de la combinación TEO:REO 1:1

4. DISCUSIÓN

Efecto de la adición de los aceites esenciales en las propiedades físicas de las películas de quitosano

La inclusión de aceites esenciales disminuyó el espesor de las películas, sin embargo el aumento de la concentración de los aceites no afectó significativamente esta propiedad. Los resultados fueron diferentes a los reportados por HOSSEINI, *et al.* [15], quien no registró diferencias significativas de espesor con la inclusión de aceites esenciales a la menor concentración, mientras que a mayores concentraciones el espesor fue alterado significativamente. Los resultados demuestran que el espesor de las películas fue influenciado por la inclusión de aceites esenciales debido a la modificación de la composición de la matriz polimérica, sin que las concentraciones de aceites empleadas llegasen a alterar significativamente el espesor [19]

Las modificaciones de la resistencia mecánica referidas a las propiedades de elongación pudieron presentarse debido a discontinuidades estructurales en la matriz polimérica [20]. Adicionalmente, los cambios en las propiedades de tensión pudieron ser producidos porque la inclusión de TEO en la matriz polimérica influenció la formación de una estructura cristalina y debilitó las uniones del hidrógeno intermolecular [21].

Por otra parte, las propiedades como el contenido de humedad, la solubilidad en agua, la capacidad de retención de agua y la permeabilidad al vapor de agua fueron modificadas debido a la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas de quitosano. Este fenómeno conduce a una disminución en la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino y limita las interacciones entre los polisacáridos y el agua por la formación de enlaces de hidrógeno [15]. Los resultados obtenidos de la solubilidad en agua fueron similares a los reportados por OJAGH, *et al.* [22]. Sin embargo, fueron contradictorios cuando fueron comparados con los resultados de ABDOLLAHI, *et al.* [23], los cuales demostraron que la inclusión de aceite esencial de romero en películas de quitosano aumenta su resistencia al agua. La inclusión de los aceites esenciales disminuyó la WVP de las películas de quitosano. El anterior fenómeno podría ocurrir por la limitación de la disponibilidad de grupos de hidrógeno para formar uniones hidrofílicas con el vapor de agua en contacto con la película. La disminución de la disponibilidad de los grupos de hidrógeno es causada por la formación de puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entre el quitosano y los componentes de los EOs [23].

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas fueron similares a PRANOTO, *et al.* [24], concluyeron que el quitosano posee actividad antimicrobiana y que la incorporación de agentes antimicrobianos en la película comestible de quitosano mejora la eficacia para inhibir el crecimiento de microorganismos.

Adicionalmente, Los resultados reportados en las pruebas de SEM sugieren que la inclusión de EOs causa una separación de fases en las soluciones poliméricas correspondiente a las gotitas de aceites esenciales incorporadas en una red polimérica continua [25]. Resultados similares fueron obtenidos en anteriores investigaciones que coinciden que el tamaño y la cantidad de poros también aumentaron con el incremento de la concentración de los aceites esenciales incluidos en las películas [25-27]. Según ABDOLLAHI, *et al.* [26], la incorporación del aceite esencial de romero en películas de quitosano provoca estructuras más flexibles y superficies agrietadas. Por otra parte, la evaporación rápida del aceite de tomillo incorporado en las películas poliméricas provoca la formación de burbujas en la superficie de las películas, así como la formación de una

estructura porosa distribuida homogéneamente [27].

Finalmente, en los ensayos de DSC, la temperatura de transición vítrea (T_g) no demostró un comportamiento térmico estable debido a que esta propiedad depende de muchos factores que influyen principalmente en la movilidad de las cadenas del polisacárido y en la estructura de la fase del sistema [28]. El efecto endotérmico se puede atribuir a la pérdida de peso por la evaporación del agua y de las trazas de disolvente [29]. La temperatura de cristalización más alta es causada por la inclusión de los aceites esenciales, así como al aumento de sus concentraciones [27].

Efecto del almacenamiento en las propiedades físicas de las películas de quitosano

Se deduce que las películas de quitosano se comportaron como una membrana hidrófila, porque cuando se encuentran en un estado de hidrogel tienen la capacidad de atrapar las moléculas de agua cuando se exponen al aire con alta humedad relativa. Durante el almacenamiento, las moléculas de agua interactuaron con las moléculas catiónicas de la matriz polimérica y son capaces de retener y absorber agua, y por consiguiente, el contenido de humedad de las películas aumenta [8, 30]. A pesar que el almacenamiento aumentó el contenido de humedad, no se registraron diferencias significativas por efecto de la inclusión de EOs, así como por efecto del tiempo de almacenamiento entre la segunda y la cuarta semana.

Adicionalmente, el aumento del contenido de humedad de las películas explicado anteriormente se asocia al descenso de la capacidad de retención de agua [30] y al efecto plastificante del agua que modifica las propiedades mecánicas de las películas. Por consiguiente, el aumento del porcentaje de elongación de las películas almacenadas a humedades altas se asocia al aumento del contenido de humedad de las películas e [9, 31]. Adicionalmente, el aumento de la temperatura produjo una disminución en los valores de deformación por punción, lo que pudo ser atribuido a la transformación gradual de los grupos amino del quitosano en grupos acetamida [10].

Finalmente, analizando los resultados obtenidos por DSC, se puede inferir que los cambios conformacionales en la microestructura de la película y el contenido de agua podrían haber modificado las propiedades térmicas de las películas, especialmente en las películas con la inclusión de los aceites esenciales ya que la temperatura de transición vítrea depende de diversos factores como la cristalinidad, la cantidad de agua, el grado de desacetilación del quitosano y las interacciones macromoleculares [32].

Resultados obtenidos en diferentes estudios concluyen que el quitosano posee la capacidad para reducir la pérdida de peso y la tasa de respiración de frutas [33]. Adicionalmente, la aplicación de recubrimientos comestibles en frutas frescas puede mantener la firmeza, dar lugar a valores más altos de acidez titulable y valores más bajos de pH, así como menor cantidad de sólidos solubles totales en comparación con el control [34, 35]. Otros estudios determinan que la aplicación de quitosano favorece los atributos sensoriales de los alimentos recubiertos, tales como el aspecto externo, la aceptabilidad visual, así como la reducción de los cambios de color en la piel y el aumento del brillo superficial [36]. Finalmente, la aplicación de revestimientos sobre alimentos evita la decoloración durante el almacenamiento, mantiene la frescura y evita el pardeamiento superficial en comparación con las frutas de control [37-39].

5. CONCLUSIONES

Se estudió el efecto del almacenamiento sobre algunas propiedades físicas de las películas de quitosano con y sin inclusión de aceites esenciales. Las modificaciones de las propiedades físicas se atribuyeron a posibles cambios químicos, tales como interacciones moleculares entre la matriz polimérica y el agua contenida en el aire circundante y a la reacetilación de los grupos amino del quitosano.

El incremento de la humedad de almacenamiento aumentó el porcentaje de elongación, sin embargo disminuyó la fuerza máxima de punción, la deformación por punción y la capacidad de retención de agua. Las películas almacenadas a bajas temperaturas reportaron mayores valores de capacidad de retención de agua y porcentaje de elongación.

La inclusión de aceites esenciales afectó notablemente la estructura interna de las películas de quitosano, sin embargo no fueron observados cambios notorios por el efecto del almacenamiento. Adicionalmente, las películas de quitosano mejoraron la capacidad para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas, sin embargo para futuros ensayos se sugiere realizar un análisis sobre la inhibición del crecimiento de hongos [40].

El estudio sugiere que las películas evaluadas en el presente estudio podrían ser usadas como empaque comestibles de alimentos, sin embargo se deduce que el carácter hidrófilo del polímero empleado limita considerablemente su aplicación en el campo de empaques para alimentos especialmente a altas humedades

de almacenamiento.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Programa Jóvenes Investigadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) y a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá - DIB.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] DUTTA, J., TRIPATHI, S., DUTTA, P.K., "Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications", *Food Science and Technology International*, v. 18, n. 1, pp. 3-34, Feb. 2012.
- [2] KENAWY, E.R., WORLEY, S.D., BROUGHTON, R., "The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review", *Biomacromolecules*, v. 8, n. 5, pp. 1359-1384, May. 2007.
- [3] KONG, M., CHEN, X.G., XING, K., et al., "Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review", *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, n. 1, pp. 51-63, 2010.
- [4] CUNHA, A.G., GANDINI, A., "Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates", *Cellulose*, v. 17, n. 6, pp. 1045-1065, Dic. 2010.
- [5] ABDEEN, Z., "Swelling and reswelling characteristics of cross-linked poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogel film", *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 32, n. 9, pp. 1337-1344, 2011.
- [6] GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P., "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients", *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, pp. 91-97, 2008.
- [7] ZHONG, Y., LI, Y.F., "Effects of storage conditions and acid solvent types on structural, mechanical and physical properties of kudzu starch (*Pueraria lobata*)-chitosan composite films", *Starch-Starke*, v. 63, n. 9, pp. 579-586, Sep. 2011.
- [8] KERCH, G., KORKHOV, V., "Effect of storage time and temperature on structure, mechanical and barrier properties of chitosan-based films", *European Food Research and Technology*, v. 232, n. 1, pp. 17-22, Ene. 2011.
- [9] SUYATMA, N.E., TIGHZERT, L., COPINET, A., "Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, pp. 3950-3957, May 2005.
- [10] NUD'GA, L., PETROVA, V., GOFMAN, I., et al., "Chemical and structural transformations in chitosan films in the course of storage", *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 81, n. 11, pp. 1992-1996, Nov. 2008.
- [11] DENG, Y., ZHU, L.W., LUO, W., "Changes in physical properties of chitosan films at subzero temperatures", *Italian Journal of Food Science*, v. 21, n. 4, pp. 487-497, 2009.
- [12] SRINIVASA, P.C., THARANATHAN, R.N., "Chitin/chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses", *Food Reviews International*, v. 23, n. 1, pp. 53-72, Mar. 2007.
- [13] CAO, W.L., CHENG, M. Y., AO, Q., et al., "Physical, mechanical and degradation properties, and Schwann cell affinity of cross-linked chitosan films", *Journal of Biomaterials Science*, v. 16, n. 6, pp. 791-807, 2005.
- [14] MEI, J., YUAN, Y., WU, Y., LI, Y. "Characterization of edible starch-chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese", *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 57, pp. 17-21, 2013.
- [15] HOSSEINI, M. H., RAZAVI, S. H., MOUSAVI, M. A. "Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils", *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 33, pp. 727-743, Dec 2009.
- [16] SRINIVASA, P.C., RAMESH, M.N., THARANATHAN, R.N. "Effect of plasticizers and fatty acids on

- mechanical and permeability characteristics of chitosan films", *Food Hydrocolloids*, v. 21, n. 7, pp. 1113-1122, Oct. 2007.
- [17] MORADI, M., TAJIK, H., ROHANI, S.M.R., "Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract", *Lwt-Food Science and Technology*, v. 46, n. 2, pp. 477-484, May. 2012.
- [18] HELANDER, I. M., NURMIAHO-LASSILA, E. L., AHVENAINEN, R., RHOADES, J., ROLLER, S., "Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, pp. 235-244, 2001.
- [19] SANCHEZ-GONZALEZ, L., CHAFER, M., CHIRALT, A., et al., "Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*", *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 2, pp. 277-283, Sep. 2010.
- [20] SANCHEZ-GONZALEZ, L., CHIRALT, A., GONZALEZ-MARTINEZ, C., et al., "Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan", *Journal of Food Engineering*, v. 105, n. 2, pp. 246-253, July 2011.
- [21] PARK, S.I., ZHAO, Y.Y. "Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 7, pp. 1933-1939, Abr. 2004.
- [22] OJAGH, S.M., REZAEI, M., RAZAVI, S. H., et al., "Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water", *Food Chemistry*, v. 122, n. 1, pp. 161-166, 2010.
- [23] ABDOLLAHI, M., REZAEI, M., FARZI, G., "A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan", *Journal of Food Engineering*, v. 111, n. 2, pp. 343-350, Jul. 2012.
- [24] PRANOTO, Y., RAKSHIT, S. K., SALOKHE, V. M., "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin", *LWT - Food Science and Technology*, v. 38, pp. 859-865, 2005.
- [25] SANCHEZ-GONZALEZ, L., GONZALEZ-MARTINEZ, C., CHIRALT, A., et al., "Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films", *Journal of Food Engineering*, v. 98, n. 4, pp. 443-452, Ene. 2010.
- [26] ABDOLLAHI, M., REZAEI, M., FARZI, G., "Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging", *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, n. 4, pp. 847-853, Abr. 2012.
- [27] ALTIOK, D., ALTIOK, E., TIHMINLIOGLU, F., "Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 21, n. 7, pp. 2227-2236, Jul. 2010.
- [28] RATTO, J., HATAKEYAMA, T., BLUMSTEIN, R.B., "Differential scanning calorimetry investigation of phase transitions in water/ chitosan systems", *Polymer*, v. 36, n. 15, pp. 2915-2919, 1995.
- [29] EL-HEFIAN, E.M.A., NASEF, M.M., YAHAYA, A. H., et al., "Preparation and characterization of chitosan/agar blends: rheological and thermal studies", *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 55, n. 1, pp. 130-136, Mar. 2010.
- [30] MURRAY, C.A., DUTCHER, J.R., "Effect of changes in relative humidity and temperature on ultrathin chitosan films", *Biomacromolecules*, v. 7, n. 12, pp. 3460-3465, Dic. 2006.
- [31] SRINIVASA, P.C., RAVI, R., THARANATHAN, R.N., "Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology", *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 1, pp. 184-189, May. 2007.
- [32] CERVERA, M.F., HEINÄMÄKI, J., RÄSÄNEN, M., et al., "Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin", *Carbohydrate Polymers*, v. 58, n. 4, pp. 401-408, 2004.
- [33] VALENCIA-CHAMORRO, S. A., PALOU, L., DEL RÍO, M. A., PÉREZ-GAGO, M. B., "Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, pp. 872-900, 2011.

- [34] ADAY, M. S., CANER, C., "Understanding the effects of various edible coatings on the storability of fresh cherry", *Packaging Technology and Science*, v. 23, pp. 441-456, 2010.
- [35] DUAN, J., WU, R., STRIK, B. C., ZHAO, Y., "Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions", *Postharvest Biology and Technology*, v. 59, pp. 71-79, 2011.
- [36] SANTOS, C. A. A., PICOLI, A. A., ROLIM, G. D. S., "Uso de quitosana e embalagem plástica na conservação pós-colheita de pêssegos' Douradão", *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, no. 1, 2008.
- [37] ALI, A., MUHAMMAD, M. T. M., SIJAM, K., SIDDIQUI, Y. "Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage", *Food Chemistry*, v. 124, pp. 620-626, 2011.
- [38] WARDY, W., PUJOLS MARTÍNEZ, K. D., XU, Z., *et al.*, "Viscosity changes of chitosan solution affect physico-functional properties and consumer perception of coated eggs during storage", *LWT - Food Science and Technology*, v. 55, pp. 67-73, 2014.
- [39] HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., ALMENAR, E., VALLE, V. D., *et al.*, "Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria xananassa*) quality during refrigerated storage", *Food Chemistry*, v. 110, pp. 428-435, 2008.
- [40] FRIEDMAN, M., JUNEJA, V. K. "Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food", *Journal of Food Protection*, v. 73, n. 9, pp. 1737-1761, 2010.