



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA
BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

***EFEECTO DE LA ADICIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITINA
SOBRE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE FILMS
COMESTIBLES ACTIVOS***

presentado por

SARA SÁNCHEZ FALCES

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y SOSTENIBILIDAD EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA**

Junio, 2023

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

**NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA
BIOCIENCIAS BIOZIENTZIETAKO GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA**

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER DEL MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y
SOSTENIBILIDAD EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

**Efecto de la adición de nanopartículas de quitina sobre las propiedades
tecnológicas de films comestibles activos**

Trabajo Fin de Máster presentado por **Sara Sánchez Falces** con el objetivo de optar al título de Máster en Tecnología y Sostenibilidad en la Industria Alimentaria siendo sus directores el Dr. Juan Ignacio Maté Caballero y la Dra. Carmen Barba González-Albo, del Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación de la Universidad Pública de Navarra.

La directora del Trabajo

El director del Trabajo

La estudiante

Dra. Carmen Barba González-Albo

Dr. Juan Maté Caballero

Sara Sánchez Falces

Pamplona, junio de 2023

RESUMEN

El uso de agentes externos en films alimentarios elaborados a partir de biopolímeros se ha estudiado en los últimos tiempos para conseguir mejorar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera. El uso de nanocompuestos además permite regular la liberación de compuestos como agentes antimicrobianos incorporados en las matrices.

El objetivo de este trabajo fin de máster es el desarrollo protocolos de elaboración de films alimentarios, con base de quitosano o WPI, con nanopartículas de quitina y compuestos activos. Se elaborarán films con carvacrol (1% w/w respecto cantidad del componente base), 2-feniletanol (10% w/w respecto cantidad de base) y dos concentraciones de nanopartículas de quitina (1,5% y 3% w/w respecto cantidad de componente base). Se evaluarán las propiedades fisicoquímicas (contenido de humedad, espesor y opacidad) como tecnológicas (permeabilidad al vapor de agua y mecánicas) y antimicrobianas de los films elaborados. Por otro lado, se estudiará también el tamaño de partícula de las disoluciones formadoras de los films de quitosano.

Con la adición de las nanopartículas de quitina se obtiene un aumento de la opacidad y menor contenido de humedad en los films. Con estas formulaciones se consigue que los valores de permeabilidad al vapor de agua disminuyan, así como los de elongación de rotura y aumenten los de tensión máxima de rotura.

En cuanto a los agentes antimicrobianos el contenido de humedad aumenta en ambas bases. La tendencia de los valores de estas formulaciones en las demás pruebas se mantiene.

Así pues, este trabajo fin de máster pretende avanzar en el conocimiento de películas alimentarias para desarrollar materiales de envasado sostenibles y que supongan una alternativa a los materiales plásticos tradicionales.

Palabra clave: quitosano, WPI, nanopartículas, quitina, carvacrol, 2-feniletanol, sostenibilidad, film.

SUMMARY

The use of external agents in food films made from biopolymers has been studied recently to improve the physicochemical, mechanical and barrier properties. The use of nanocomposites also allows for regulating the release of compounds such as antimicrobial agents incorporated into the matrices.

The objective of this master's thesis is to develop protocols for the preparation of food films, based on chitosan or WPI, with chitin nanoparticles and active compounds. Films will be made with carvacrol (1% w/w with respect to the amount of the base component), 2-phenylethanol (10% w/w with respect to the amount of base) and two concentrations of chitin nanoparticles (1.5% and 3% w/w about the amount of base component). The physicochemical (moisture content, thickness, and opacity) as well as technological (water vapor and mechanical permeability) and antimicrobial properties of the produced films will be evaluated. On the other hand, the particle size of the solutions that form the chitosan films will also be studied.

With the addition of chitin nanoparticles, opacity, and lower moisture content in the films are obtained. With these formulations it is achieved that the values of permeability to water vapor decrease, as well as those of elongation at break and increase those of maximum stress at break.

With the addition of antimicrobial agents, the moisture content increases in both bases. The trend of the values of these formulations in the other tests is maintained.

Thus, this master's thesis aims to advance knowledge of food films to develop sustainable packaging materials that represent an alternative to traditional plastic materials.

Keywords: chitosan, WPI, nanoparticles, chitin, carvacrol, 2-phenylethanol, sustainability, film.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Deterioro alimentario y envasado.	1
1.1.1.	Nuevas tendencias de envasado	2
1.2.	Películas y recubrimientos comestibles.....	3
1.2.1.	Películas biodegradables	3
1.3.	Quitina y quitosano	6
1.3.1.	Obtención de la quitina y el quitosano	6
1.3.2.	Características del quitosano	6
1.4.	Proteína de suero lácteo.....	7
1.4.1.	Métodos de obtención de las proteínas de suero lácteo.....	7
1.5.	Nanopartículas en el envasado alimentario	8
1.6.	Propiedades fisicoquímicas	8
1.6.1.	Contenido en humedad.....	8
1.6.2.	Transparencia	8
1.7.	Propiedades mecánicas.....	9
1.8.	Propiedades de barrera a la transferencia de materia	9
1.8.1.	Permeabilidad al vapor de agua.....	9
1.8.2.	Permeabilidad a lípidos	10
1.8.3.	Permeabilidad a gases	10
2.	Objetivos y diseño experimental	10
2.1.	Diseño experimental.....	10
3.	Materiales y método.....	11
3.1.	Materiales utilizados	11
3.1.1.	Componentes utilizados en la elaboración de las películas	11
3.1.2.	Materiales auxiliares	13
3.2.	Métodos.....	13
3.2.1.	Preparación de las películas	13
3.2.2.	Caracterización del tamaño de partícula de las soluciones formadoras de films	17
3.2.3.	Caracterización de las propiedades de los films.....	19
3.2.4.	Caracterización de las propiedades antimicrobianas	21
3.2.5.	Análisis estadístico	23
4.	Resultados	24
4.1.	Apariencia de los films.....	24
4.2.	Tamaño de partícula de las soluciones formadoras de films	24
4.3.	Opacidad	27
4.4.	Contenido de humedad.....	27

4.5.	Permeabilidad al vapor de agua.....	28
4.6.	Propiedades mecánicas.....	29
4.7.	Propiedades antimicrobianas.....	30
5.	Conclusiones	32
6.	Bibliografía	33
7.	Apéndice	37
7.1.	ANEXO I: ficha técnica del quitosano.....	37
7.2.	ANEXO II: ficha técnica del glicerol.....	38
7.3.	ANEXO III: ficha técnica del carvacrol.....	39
7.4.	ANEXO IV: ficha técnica del 2-feniletanol.....	40

Índice de figuras

Figura 1.	Estructura química de la quitina y del quitosano (Santos et al., 2020a).	4
Figura 2.	Estructura química del carvacrol (Marinelli et al., 2018).	5
Figura 3.	Estructura química del 2-feniletanol (Zhu et al., 2011).	5
Figura 4.	Quitosano empleado en la elaboración de los films de quitosano.	11
Figura 5.	Nanopartículas de quitina empleadas en la elaboración de las películas.	12
Figura 6.	Unidad de análisis (MS3000), unidad de dispersión (Hydro EV) y PC con el software de control y análisis de resultados (Malvern 3.81).	17
Figura 7.	Micrómetro digital (ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón)	19
Figura 8.	Espectrofotómetro utilizado para la medida de opacidad de los films (UH5300, Hitachi, Japón).	19
Figura 9.	Cabina Sanplatec utilizada para el ensayo de permeabilidad al vapor de agua.	21
Figura 10.	Apariencia de alguna de las diferentes películas despegadas. En la primera fila se pueden apreciar las formulaciones de WPI, WPI_NWQ1,5_CARV y WPI_NWQ3_2FOH y, en la fila de abajo las de Q, Q_NWQ1,5_CARV y Q_NWQ3_2FOH.	24
Figura 11.	Resultados del promedio de Dx(50) para cada una de las formulaciones analizadas siendo el experimento 1 con agua desionizada como dispersante y el experimento 2 siendo como dispersante agua desionizada con 1% de ácido acético.	25
Figura 12.	Representación del tamaño de partícula en función del tiempo para diferentes disoluciones formadoras de films: Q, Q_NWQ1.5, Q_NWQ3, disolución un 1,5% de NWQ. Los ensayos con el número 2 se hicieron con dispersante con un 1% de ácido acético frente a los que tienen el 1 con dispersante agua desionizada.	26
Figura 13.	Valores medios de opacidad en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).	27
Figura 14.	Valores medios de humedad en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).	28
Figura 15.	Valores medios de WVP en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).	28
Figura 16.	Valores medios de tensión máxima en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).	29

Figura 17. Valores medios de elongación relativa en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$).....	30
Figura 18. Resultados de inhibición microbiana en <i>P. fragi</i> (A, B, C) y <i>E. coli</i> (D, E, F) para las diferentes formulaciones siendo AyD : WPI, WPI_NWQ1.5 y WPI_NWQ3, ByE : WPI_CARV, WPI_NWQ1.5_CARV y WPI_NWQ3_CARV CyF : WPI_SFOH, WPI_NWQ1.5_2FOH y WPI_NWQ3_2FOH.....	31

Índice de tablas

Tabla 1. Diseño experimental de las películas	11
Tabla 2. Parámetros del quitosano utilizado en la elaboración de las películas.....	11
Tabla 3. Composición química del aislado de proteína de suero lácteo utilizado.....	12
Tabla 4. Parámetros del carvacrol utilizado en la elaboración de las películas.....	12
Tabla 5. Parámetros del 2-feniletanol utilizado en la elaboración de las películas.....	12
Tabla 6. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano.....	14
Tabla 7. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano y nanopartículas de quitina.....	14
Tabla 8. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano, nanopartículas de quitina y carvacrol.....	14
Tabla 9. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol.....	15
Tabla 10. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI.....	15
Tabla 11. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WP y nanopartículas de quitina.....	16
Tabla 12. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI, nanopartículas de quitina y carvacrol.....	16
Tabla 13. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol.....	17
Tabla 14. Parámetros del ensayo para las propiedades mecánicas.....	20
Tabla 15. Condiciones óptimas de crecimiento para cada bacteria.....	22
Tabla 16. Resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antimicrobiana para las formulaciones de WPI	31
Tabla 17. Resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antimicrobiana para las formulaciones de quitosano . NA: No actividad.....	32

1. Introducción

1.1. Deterioro alimentario y envasado.

Los alimentos son esenciales para el mantenimiento de la vida humana ya que son los que proporcionan los nutrientes necesarios para el correcto crecimiento y funcionamiento del organismo. Los alimentos son materia orgánica lo cual implica que son susceptible a la degradación y el deterioro por lo que la conservación de los alimentos es un tema crítico para la seguridad alimentaria y la salud pública.

El deterioro alimentario es un fenómeno que ocurre a lo largo de todo el ciclo de vida de los alimentos. Este proceso puede producirse por diversos factores como la acción de microorganismos, la oxidación, la deshidratación y otros factores físicos, químicos y biológicos. Como consecuencia de esto se da una pérdida de la calidad, seguridad e inocuidad del alimento que puede derivar en enfermedades y la pérdida de valor comercial de estos.

Debido a esto la industria alimentaria busca constantemente nuevas soluciones para alargar la vida útil de los alimentos y conseguir mantener su calidad, seguridad e inocuidad. Así pues, el envasado alimentario juega un papel muy importante a la hora de la conservación de estos ya que protegen a los alimentos de la contaminación externa y prolongan su vida útil. Para el envasado sea eficiente ha de conseguir una disminución en diferentes efectos que puedan causar una alteración en los alimentos. Estos efectos adversos pueden ser causados por tres factores:

- Factores **biológicos**. Estos factores pueden darse bien por reacciones enzimáticas, parásitos o debido a microorganismos. Estos últimos provocan un deterioro alimentario que puede ser o no deseado, en el caso de que no sea deseado este deterioro puede afectar tanto a la calidad higiénica como a la calidad sensorial. Este factor es el más importante a tratar puesto que se pueden llegar a producir infecciones e intoxicaciones.
- Factores **químicos**; pueden aparecer en cualquiera de las diferentes etapas que se dan en la cadena alimentaria y pueden tener diversos orígenes como aditivos alimentarios (nitritos, sulfitos, vitaminas...), restos de plaguicidas o medicamentos veterinarios y detergentes y desinfectantes utilizados en la limpieza de las instalaciones.
- Factores **físicos**. Este factor comprende a cualquier material extraño que pueda ser dañino y que, de manera habitual, no se encuentre en el alimento. Ejemplo de esto pueden ser restos de vidrios, metales o plásticos.

Cabe destacar que el deterioro producido por los microorganismos es uno de los problemas más comunes en la industria alimentaria considerando el desperdicio alimentario y las graves consecuencias para la salud pública que puede conllevar (Simbine et al., 2019). Si bien es cierto que en muchas ocasiones el desarrollo microbiano es buscado, como en el caso de la producción del yogur o la cerveza, en muchos casos se intenta que no suceda ya que muchos de ellos son patógenos y pueden provocar enfermedades (Mato Martínez, 2017). Es por ello que los sistemas de aseguramiento de la calidad son esenciales para generar productos alimentarios libres de peligros microbiológicos. La consecución de este efecto antimicrobiano puede conseguirse aplicando de manera directa los agentes antimicrobianos al alimento o en el espacio que los rodea. En esa misma línea se han desarrollado envases activos con propiedades antimicrobianas para gran cantidad de alimentos y, en especial, con agentes antimicrobianos en ellos para mejorar su calidad y mantenerlos fuera del peligro microbiano (Simbine et al., 2019).

Así pues, el envasado de los alimentos ha de conseguir disminuir los efectos de los diferentes mecanismos que puedan suponer una alteración para conseguir el grado posible más alto de calidad. Para que un envase sea adecuado tiene que conseguir, como ya se ha mencionado, una mejora en la conservación del alimento y aumento en la vida útil y ha de lograr que el producto resulte atractivo a los consumidores puesto que supone la imagen de una marca. Si estos aspectos

se cumplen se consigue que las ventas, o consumo del producto, aumente satisfaciendo las expectativas de los diferentes sectores implicados.

Es importante conocer que hay diferentes tipos de envases y que, dependiendo de cual se trate, cumplirá una función determinada.

- Envase primario: aquel envase que está en contacto directo con el alimento, normalmente, tiene función de protección y conservación.
- Envase secundario: cubre al envase primario y al alimento, generalmente es el envase comercial teniendo así la función de informar. En este envase se suele encontrar la etiqueta.
- Envase terciario: el comprador del producto no ve este envase puesto que es el embalaje en el que llega el alimento a la tienda donde se comercializa. Tiene la función de protección mecánica y contiene códigos comerciales que facilitan el seguimiento y la trazabilidad del producto acabado.

Una vez conocidos los diferentes tipos de envases se pueden relacionar diferentes funciones que cumplen para el alimento. A continuación, aparecen señaladas algunas de las más importantes:

- Contención: el envase ha de contener físicamente al alimento y facilitar su manejo.
- Comunicación: esta viene determinada por el etiquetado puesto que en este aparece indicado todo lo que el consumidor ha de conocer del producto como la lista de ingredientes, alérgenos o contacto con la empresa productora. Así mismo pueden aparecer etiquetas de diferentes promociones o publicidad.
- Comodidad de uso: desde el punto de vista del consumidor los envases deben ser apropiados a las nuevas tecnologías (microondas, autoenfriables, autocalentables...) así como con un tamaño adecuado a las nuevas modas y con facilidad de apertura, manejo y conservación posterior. Desde el punto de vista del distribuidor el envase ha de tener la forma adecuada para que se puedan preparar fácilmente envases secundarios y terciarios, así como facilitar la trazabilidad con, por ejemplo, códigos de barras.
- Protección y conservación: el envase tiene que ser capaz de mantener el mayor grado de calidad de un alimento mediante el frenado o suspensión de los distintos mecanismos de alteración. El embalaje debe ser inocuo, es decir, se tiene que evitar que haya migración del recipiente al alimento.

1.1.1. Nuevas tendencias de envasado

En los últimos años el uso de los plásticos ha incrementado y, debido a su baja capacidad de degradación y difícil reciclaje estos suponen un grave problema al acumularse en el medioambiente dando como resultado un grave problema. El plástico muy utilizado en multitud de sectores debido a que tiene unas características únicas y es que cuenta con una gran versatilidad y durabilidad y un bajo precio. Con el paso del tiempo este material tan utilizado y apreciado por la industria acaba degradándose en fragmentos más pequeños conocidos como microplásticos. Los microplásticos son pequeñas partículas y fibras de plástico y, aunque no hay estándares claramente establecidos, son considerados como tal cuando su diámetro es inferior a 5 milímetros (Lusher et al., 2017).

Este creciente problema sumado a la mayor concienciación de la población sobre el medioambiente y la alimentación saludable hace que la demanda de productos más sostenibles se vea notablemente incrementada. Para conseguir solventar esta demanda se desarrollaron las películas comestibles y los envases activos y/o biodegradables. De la misma manera, debido al ritmo de vida tan acelerado que actualmente se tiene, las tendencias indican que los consumidores

también priman la facilidad de uso de los envases, es decir, facilidad de uso de estos, transporte o manejabilidad.

1.2. Películas y recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles se pueden definir como una capa delgada de un material comestible que forma un revestimiento sobre el alimento, en cambio, los films comestibles se definen como una capa preformada elaborada con un material comestible y, que una vez elaborada, puede ser colocada sobre un alimento o sobre los componentes de este con la finalidad de mejorar la calidad y aumentar la vida útil (Marzo Rojas, 2010; Otín Acín, 2011). Así pues, estos componentes tienen la función tanto de embalaje como de ser constituyentes del propio alimento por lo que han de cumplir varias condiciones entre las que se encuentran (Huber & Embuscado, 2009; Ziani et al., 2011):

- No toxicidad.
- Buenas propiedades sensoriales y organolépticas.
- Buena adhesión a la superficie del alimento.
- Tecnología requerida sencilla y bajo costo de la materia prima.

Además, es necesario destacar que, el uso de películas comestibles también aporta numerosas ventajas al producto ya que estas pueden ser ingeridas por el consumidor, por lo general los materiales son de origen natural y poco costoso y su uso reduce los deshechos y la contaminación ambiental ya que permiten la utilización de envases más simples al proteger al alimento a cambios de humedad, pérdida de aromas o enranciamiento por oxígeno. Así mismo los films comestibles también pueden suponer una mejora de las propiedades organolépticas, así como proporcionar una protección individual a determinadas porciones del alimento (Marzo Rojas, 2010).

1.2.1. Películas biodegradables

Como ya se ha mencionado anteriormente, los consumidores cada vez cuentan con una concienciación mayor sobre los diversos problemas medioambientales y demandan productos más sostenibles y respetuosos con este. Uno de estos problemas es la presencia de los microplásticos y su efecto en los ecosistemas y la cadena trófica, por ello se están estudiando alternativas a los plásticos. Como alternativa a estos se presentan los conocidos como 'plásticos/películas biodegradables' asociados al uso de materias primas renovables que no aportan sustancias tóxicas a los suelos, aguas o seres vivos.

Debido a esto, en la actualidad, las películas biodegradables son objeto de numerosas investigaciones gracias a la gran cantidad de posibilidades que ofrecen. Con estas lo que se busca es igualar a los plásticos convencionales en cuanto a propiedades mecánicas como a las propiedades de barrera a gases, aromas... Estas características dependen del polímero que se utilice como matriz para su elaboración, a continuación, se recogen algunos de los polímeros más usados para la síntesis de películas:

❖ Hidrocoloides

Los hidrocoloides engloban a los polisacáridos y las proteínas. Así pues, las películas elaboradas con estos compuestos se pueden usar en aplicaciones donde el control de la migración de agua no es el objetivo. Debido a su carácter hidrofílico estas pueden ser disueltas sin alterar las propiedades sensoriales del alimento sobre el que se aplican (Garde Izquierdo, 2014).

- Quitina y quitosano

Uno de los polisacáridos más estudiados en los últimos años para la elaboración de películas es el quitosano por ser un excelente formador de películas. El quitosano es un derivado de la **quitina**, principal componente estructural de los exoesqueletos de crustáceos, uno de los desechos de la industria alimentaria. La quitina está compuesta por unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4) de manera que forman una cadena lineal. El **quitosano** es un derivado de esta quitina compuesto por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosas unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4).

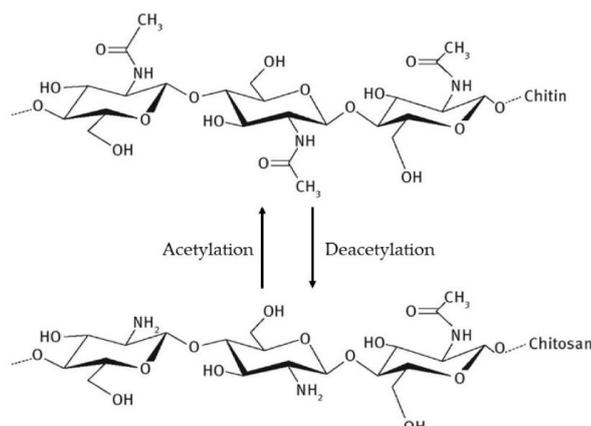


Figura 1. Estructura química de la quitina y del quitosano (Santos et al., 2020a).

➤ Proteína de suero lácteo (WPI)

Las películas basadas en proteína de suero lácteo han recibido gran atención en las últimas décadas debido a que estas son comestibles, biodegradables y la materia prima proviene de un subproducto de la industria del queso (Mastromatteo et al., 2009). Para la formación de estos films básicamente se ha de dar una desnaturalización de las proteínas de suero en soluciones acuosas, con esta desnaturalización se modifica la estructura tridimensional de la proteína favoreciendo los enlaces S-S intermolecular y las interacciones hidrofóbicas durante el secado. Cabe destacar que para la elaboración de estos se necesitan plastificantes para reducir la fragilidad y aumentar la flexibilidad. Con estos plastificantes lo que se consigue es la reducción de los enlaces de hidrógeno interpoliméricos favoreciendo la movilidad de la cadena (Apesteguía Izurdiaga, 2019).

Los films resultantes son transparentes, insípidos y flexibles y proporcionan una excelente barrera a oxígeno, aromas y aceites. Si bien es cierto que debido a su carácter hidrofílico poseen malas propiedades como barrera a la humedad mediante la incorporación de materiales lipídicos se consigue mejorar esto (Gennadios, 2002; McHugh & Krochta, 1994).

❖ **Lípidos**

Los films elaborados con compuestos lipídicos tienen la característica de presentar una gran propiedad de barrera a la humedad debido a su comportamiento hidrofóbico. Dentro de este grupo se encuentran las ceras, ácidos grasos, resinas y diglicéridos. Cabe destacar que su uso de forma pura está limitado porque no tienen suficiente integridad estructural ni durabilidad. Por este hecho muchas veces son combinados con los hidrocoloides dando lugar a los films compuestos (Marzo Rojas, 2010; Yousuf et al., 2022).

Dentro de los lípidos se encuentran los aceites esenciales, mezclas de compuestos químicos sintetizados por plantas como terpenos, alcoholes o cetonas. Los aceites esenciales son antimicrobianos naturales y altamente efectivos contra bacterias y hongos (Puškárová et al., 2017). La acción antimicrobiana de estos aceites se puede atribuir a los monoterpenos que, debido a su carácter lipofílico, rompen la membrana citoplasmática microbiana. Desafortunadamente

estos son inestables biológicamente y poco solubles en agua (Campos et al., 2011; Liolios et al., 2009).

➤ Carvacrol

El carvacrol es un fenol monoterpreno, figura 2, componente del aceite esencial de orégano y de tomillo. Es considerado como un compuesto antimicrobiano de amplio espectro efectivo contra levaduras, hongos y bacterias. A pesar de esto tanto la implicación del carvacrol como la de otros aceites esenciales se ve limitada debido a sus propiedades aromáticas que puede ser indeseado (Knowles et al., 2005).

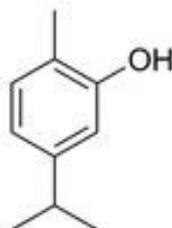


Figura 2. Estructura química del carvacrol (Marinelli et al., 2018).

➤ 2-feniletanol

El 2-feniletanol, figura 3, es un compuesto de origen natural que cuenta con numerosas aplicaciones debido a su carácter bacteriostático y antifúngico. El problema principal de este compuesto es su alta inestabilidad y volatilidad (Zarandona et al., 2020). El 2-feniletanol se obtiene por extracción de diferentes fuentes naturales, como aceites esenciales de flores y plantas, aunque por lo general se encuentra en bajas concentraciones exceptuando el aceite de rosas dónde se encuentra en torno al 60% (Bergadà Miró, 2007).

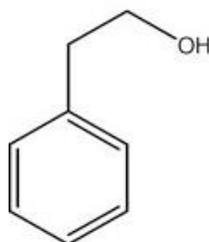


Figura 3. Estructura química del 2-feniletanol (Zhu et al., 2011).

❖ **Compuestos**

Así pues, como ya se ha comentado, los films compuestos son resultantes de la combinación, principalmente, de hidrocoloides junto con lípidos. Con esta combinación se busca obtener las ventajas de ambos componentes. Otro de los elementos que ha sido objeto de estudio es la adición de nanorellenos. Estos están regulados según el Reglamento (UE) 2015/2283 e indica que un nanomaterial artificial es cualquier material producido intencionadamente y que tenga unas dimensiones de 100 nm o menos. Según esta definición cualquier tipo de envasado que tenga algún elemento de este orden deberá estar señalado con la palabra ‘nano’ detrás del componente.

En este proyecto se va a trabajar con nanopartículas de quitina. La elección de material se debe a que la quitina proviene de deshechos alimentarios, tiene bajo costo de producción y buena biocompatibilidad. Con este tipo de nanopartículas se han realizado numerosos estudios para comprobar qué efecto tiene su adición en las propiedades finales de las películas. Se reportó que

las propiedades mecánicas, así como la propiedad de barrera a la humedad mejoraron (Joseph et al., 2020; Lu et al., 2004; Salaberria et al., 2015).

1.3. Quitina y quitosano

Como se ha comentado anteriormente el quitosano es un derivado de la quitina, uno de los principales componentes estructurales que se encuentra presente en hongos, algas e insectos, aunque su mayor fuente se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos. Puesto que en la industria alimentaria los productos marinos generan una gran cantidad de residuos, provocando así un problema medioambiental, se busca solventarlo reutilizando los desechos para la obtención de este compuesto.

La quitina se caracteriza por ser insoluble en agua y en disolventes orgánicos, presenta alto peso molecular. El compuesto es capaz de formar diferentes tipos de estructuras cristalinas que se diferencian por el número de cadenas, el grado de hidratación y el tamaño de la unidad. Se denominan como α , β y γ siendo la α -quitina la más abundante (Santos et al., 2020).

Tal y como se ha comentado anteriormente el quitosano es un derivado de la quitina y para que sea considerado como tal ha de tener un grado de desacetilación de, al menos, 50%. Este porcentaje generará diferentes características estructurales que afectarán a las propiedades fisicoquímicas y biológicas del polímero final (Santos et al., 2020). Además, este presenta características muy interesantes como pueden ser sus propiedades antimicrobianas, no tóxicas, biodegradables y que, las películas resultantes, cuentan con buenas propiedades mecánicas y con una permeabilidad selectiva a gases (Liu et al., 2017). Sin embargo, y como ya se ha comentado, los hidrocoloides se caracterizan por su alta permeabilidad a la humedad por lo que, en muchos casos, para conseguir mejorar esto se añaden compuestos hidrófobos como lípidos o nanopartículas (Elsabee & Abdou, 2013).

1.3.1. Obtención de la quitina y el quitosano

Para la extracción de la quitina se ha de partir de una materia prima rica en ella, como se ha comentado, una de las principales fuentes son los caparazones de los crustáceos ya que pueden contener en torno a 15-40% de quitina (Kurita, 2006). Para ello el proceso de extracción y obtención de quitosano ha de tener, como mínimo, cuatro etapas:

- 1) Preparación de la materia prima: las conchas se someten a un tratamiento con ácido clorhídrico diluido para poder eliminar sales metálicas (Kurita, 2006).
- 2) Desmineralización: esta etapa se realiza con una disolución diluida de ácido clorhídrico, es importante destacar que esta etapa dependerá de la materia prima que se utilice y se tendrá que adaptar a ella. Una vez realizada la desmineralización se lava el sólido resultante hasta que se queda libre de ácido la muestra (Kumari et al., 2015).
- 3) Desproteización: las cáscaras se muelen y calientan a unos 100 °C en 1-2 mol/L de hidróxido de sodio para descomponer las proteínas y los pigmentos (Kurita, 2006).
- 4) Desacetilación: el quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina, la α -quitina se desacetiliza sometiéndola a una solución de hidróxido de sodio diluido al 40-50% a 120-150 °C (Kurita, 2006).

1.3.2. Características del quitosano

El quitosano es un polímero que se obtiene, en su gran mayoría, a partir de la quitina de camarones y cangrejos mediante una desacetilación alcalina. Este compuesto es insoluble en la mayoría de los solventes, pero presenta solubilidad en ácidos orgánicos diluidos como el ácido

acético o el ácido succínico. Así pues, su uso está limitado debido a su insolubilidad, su alta viscosidad y su tendencia a coagularse con proteínas a pH alto (Rabea et al., 2003). Cabe destacar que las películas basadas en quitosano presentan una alta permeabilidad al vapor de agua limitando su uso. Para mejorar la permeabilidad al vapor de agua se suelen añadir elementos que, como resultado, empeoran las propiedades mecánicas de estos (Elsabee & Abdou, 2013).

1.4. Proteína de suero lácteo

Las proteínas de suero lácteo (WPI) son globulares y solubles en un gran intervalo de pH además presentan un gran interés desde el punto de vista económico y nutricional. Existen diferentes tipos de proteínas de suero de leche (UDLAP, 2017):

- β -lactoglobulina: supone aproximadamente la mitad de las proteínas totales del suero de leche procedente de vaca. Contiene 84 de los aminoácidos esenciales y es la causante de la resistencia a la digestión originando intolerancias y/o alergias.
- α -lactoalbúmina: son las principales proteínas de la leche humana y bovina con una gran variedad de aminoácidos. Cuando es purificada se utiliza en las formulaciones para lactantes.
- Inmunoglobulinas: se corresponden con los anticuerpos que constituyen, aproximadamente, un 75% de los anticuerpos de un adulto. Se transfieren de la madre al niño en el útero a través de la sangre y en la lactancia materna.
- Lactoferrina: es un agente antioxidante, se compone por, más o menos, 700 aminoácidos residuales. Las fuentes dietéticas son la leche, el yogur, el queso entre otros.

1.4.1. Métodos de obtención de las proteínas de suero lácteo

Las proteínas de suero lácteo suelen ser aisladas mediante filtración de membrana, de esta manera se consiguen concentrados de proteína láctea (MCP) cuando se alcanza el grado de pureza en torno al 40-80%, aislado de proteína (MPI) cuando el grado de pureza es superior al 90%, o el hidrolizado de proteína de suero (WPI) (Rebouillat & Ortega-Requena, 2015).

A continuación, se detallan algunos de los principales métodos para la separación de las proteínas (Apesteguía Izurdiaga, 2019):

- Ultrafiltración y microfiltración. Estas dos son procedimientos que posibilitan la separación de todas las proteínas de suero de leche mediante una membrana semipermeable que permite la diferenciación de las proteínas de lactosa y sales solubles.
- Precipitación isoelectrica a pH de 4,6 y 20 °C. Se provoca la precipitación de las proteínas a pH y temperatura ya indicados y se recuperan mediante una filtración o una centrifugación.
- Precipitación por etanol. Es un método mediante el cual se provoca la precipitación de las caseínas en un 40% a etanol y las proteínas de suero se solubilizan. Cabe destacar que esta no es un método que se use a nivel industrial.
- Filtración en gel. Esta técnica permite la separación de las caseínas de las proteínas de suero a través de una cromatografía de permeación. Al igual que el anterior no se utiliza a escala industrial y rara vez a nivel de laboratorio.

El WPI en particular se puede obtener como subproducto de la elaboración de productos lácteos como el queso. Dependiendo de su origen tendrá una apariencia y sabor diferente. El WPI que contiene entre el 34-35% de proteína también tiene gran cantidad de lactosa y minerales. Si

el nivel de proteína se encuentra en torno al 80% el contenido en carbohidratos es bajo y presenta buenas propiedades de gelificación, emulsificación y formación de espumas. Si este nivel de proteína es superior y está alrededor del 90% el porcentaje restante es una combinación de agua, grasa, lactosa y ceniza (Rebouillat & Ortega-Requena, 2015).

1.5. Nanopartículas en el envasado alimentario

La nanotecnología abarca la manipulación, la fabricación y caracterización de estructuras y tamaños a nanoescala que van desde 1 a 100 nm de longitud. Numerosas empresas en todo el mundo están utilizando la nanotecnología en la fabricación de sistemas de envasado de alimento ya que puede desempeñar un papel muy importante en la detección del crecimiento o la presencia de bacterias en el envase (Dash et al., 2022). Así pues, las nanopartículas son elementos que han adquirido gran importancia en los últimos años su uso en el envasado alimentario con la finalidad de conservar los productos alimentarios durante periodos más prolongados. El uso de envasado con nanocompuestos tiene grandes ventajas como es la reducción del uso de conservantes para la reducción del crecimiento microbiano (Hoseinnejad et al., 2018).

Hay diferentes tipos de nanorrellenos que son utilizados en las matrices poliméricas y que se pueden agrupar en nanoestructuras inorgánicas, orgánicas y de carbono:

- Nanorrellenos inorgánicos: la síntesis de estos compuestos se realiza, principalmente, mediante métodos fisicoquímicos y biológicos. Se ha comprobado que nanorrellenos metálicos como pueden ser de plata, cobre u oro son reactivos contra microorganismos obteniendo una mayor importancia en la investigación ya que pueden ser utilizados tanto en aplicaciones biomédicas como en el envasado alimentario. En este último caso se ha demostrado que la incorporación de estas nanorrellenos en una matriz de quitosano ha conseguido mejorar las propiedades de permeabilidad al vapor de agua (Kadam et al., 2019).
- Nanorrellenos orgánicos: hay que destacar que, dentro de este grupo, uno de los materiales más utilizados son la arcilla ya que suponen un bajo coste y hay una gran disponibilidad de ellos en la naturaleza. Las nanopartículas de quitina y quitosano han sido objeto de estudio en los últimos años debido a que no presentan toxicidad, tienen gran biocompatibilidad y capacidad antimicrobiana (George & Ishida, 2018).
- Nanorrellenos de carbono: dentro de los nanorrellenos de carbono el grafeno ha sido utilizados para la mejora de las propiedades de polímeros. La atención en este tipo de nanorrelleno se debe a que tiene unas excelentes propiedades mecánicas y de conductividad tanto térmica como eléctrica (George & Ishida, 2018).

1.6. Propiedades fisicoquímicas

1.6.1. Contenido en humedad

El contenido de **humedad** final en las películas es un parámetro a tener en cuenta debido que, dependiendo de este, las propiedades resultantes variarán. A un mayor contenido de humedad se dan unos valores mayores de permeabilidad al vapor de agua y una mejora en las propiedades mecánicas.

1.6.2. Transparencia

La **transparencia** de la película puede ser un parámetro determinante en su finalidad ya que esta puede influir en la decisión de compra de un producto por parte del consumidor. Dependiendo del producto al que vaya destinado el envase conviene una mayor o menor transparencia, en el

caso de que, por ejemplo, se produzca una degradación por la luz se utilizarán envases menos transparentes como es el caso del aceite de oliva. Para la medición de la absorbancia es utilizado un **espectrofotómetro** que registra la absorbancia a una determinada longitud de onda.

1.7. Propiedades mecánicas

El estudio de las propiedades mecánicas tiene gran importancia debido a que las películas desarrolladas han de mantener cierta integridad a la hora de su manejo, embalaje y transporte. Es por ello importante destacar que las propiedades mecánicas de los films van a depender, en gran medida, del material que se emplee en su elaboración. De la misma manera la interacción del material principal con otras sustancias como puedan ser el agua, plastificantes, lípidos u otros aditivos van a influir notablemente en el comportamiento final (Garde Izquierdo, 2014).

Para realizar el estudio de las propiedades mecánicas se analizan los siguientes parámetros (Marzo Rojas, 2010):

- Tensión máxima (σ_{\max}): máxima tensión que la película es capaz de soportar en el ensayo de tracción.
- Elongación relativa: se corresponde con la diferencia de la longitud original del film hasta su rotura expresada en porcentaje.
- Módulo de elasticidad o módulo de Young: se ajusta al cociente entre la tensión y la elongación en la región elástica, mide la rigidez de la película.

1.8. Propiedades de barrera a la transferencia de materia

1.8.1. Permeabilidad al vapor de agua

La **permeabilidad al vapor de agua** (Water Vapor Permeability, WVP) es una medida mediante la cual se puede saber la facilidad que tiene el material que se analiza de ser atravesado por el vapor de agua. Este es un proceso basado en la difusión por gradiente de concentración, es decir, el vapor de agua pasa a través de la membrana por evaporación. Este proceso dependerá de la naturaleza del polímero, su estructura y sus características, también influye el tamaño, forma y polaridad de la molécula que pasa a través de la matriz polimérica.

Como se mencionó anteriormente los polímeros formados a partir de hidrocoloides, moléculas con naturaleza hidrofílica, son aquellos que presentarán unos valores mayores de permeabilidad al vapor de agua frente a aquellas que contengan compuestos hidrofóbicos. Estos compuestos hidrofóbicos serán los que dificulten el paso de las moléculas de vapor de agua a través de la matriz (Marzo Rojas, 2010).

Diversas técnicas han sido desarrolladas para el estudio de este tipo de permeabilidad como el uso de **sensores infrarrojos** que es capaz de detectar la transferencia del vapor de agua. Esta transferencia ocurre como resultado del diferencial de presiones parciales que hay a los dos lados del film ya que en una cara hay una humedad relativa muy alta y en el otro la humedad es del 0%. Para mantener las condiciones del 0% HR una corriente de nitrógeno es la encargada de arrastrar el vapor de agua difundido y el sensor de infrarrojos mide la HR que porta esta corriente. Esta técnica, aunque rápida también es muy cara, es por ello que se han desarrollado otros métodos que abaraten costes como pueden ser las técnicas gravimétricas (Marzo Rojas, 2010).

Las **técnicas gravimétricas** es el tipo de ensayo más usado en la determinación de la permeabilidad al vapor de agua en películas comestibles. Esta consiste en crear un sistema aislado y hermético en el que el film sella un recipiente que contiene una cantidad determinada de agua,

es importante que entre el agua y la película haya un espacio de aire. A lo largo del tiempo se hacen medidas de peso del sistema periódicamente para conocer la cantidad de vapor de agua que ha atravesado el film, es decir, la pérdida de peso (Garde Izquierdo, 2014).

1.8.2. Permeabilidad a lípidos

Por lo general, a la hora de la elaboración de películas biodegradables muchos de los componentes utilizados poseen carácter hidrofílico lo que supone que son buenas barreras a lípidos. Este tipo de permeabilidad se puede medir por diferentes métodos, uno de ellos es el **método de la tasa de migración**. Este consiste en la colocación de un parche de algodón en un lado del film midiendo el tiempo necesario para que se de un cambio visual. Otro de los métodos utilizados es el **método de permeabilidad** para el cual se separan dos cámaras que contienen aceites con la película a analizar entre dos láminas de acero inoxidable, la tasa de migración se determina gracias a la utilización de un espectrofotómetro (Marzo Rojas, 2010).

1.8.3. Permeabilidad a gases

El valor de permeabilidad a los gases puede ser un factor determinante de la película dependiendo de la finalidad que se quiera. Si el film tiene la finalidad de liberación de gases resultantes de la respiración de un producto fresco interesara pues que la película permita esta liberación. Por otra parte, puede darse el caso de que esto no sea lo deseado como en el caso de alimentos ricos en grasas insaturadas y que lo que se busque sea una baja permeabilidad, en este caso, al oxígeno (Marzo Rojas, 2010).

Para la determinación de la permeabilidad da los gases se usan métodos como la **cromatografía de gases**, métodos manométricos o **sensores volumétricos**. De estos métodos el primero es el más sensible de todo (Marzo Rojas, 2010).

2. Objetivos y diseño experimental

El **objetivo** de este trabajo es el estudio del efecto de la adición de nanopartículas de quitina sobre las características de películas biodegradables antimicrobianas. Fundamentalmente se pretende conocer si realmente las nanopartículas de quitina afectan en la difusión los agentes antimicrobianos y, por tanto, sobre sus propiedades antimicrobianas.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

1. Desarrollo de protocolos de elaboración de películas de quitosano y WPI con la incorporación de nanopartículas de quitina y agentes antimicrobianos, carvacrol o 2-feniletanol.
2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas (contenido en humedad, opacidad y espesor), mecánicas (resistencia a la tracción) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua).
3. Estudio del comportamiento antimicrobiano y cómo este se ve afectado por las nanopartículas de quitina.

2.1. Diseño experimental

Para el desarrollo de este trabajo se elaboran las siguientes formulaciones tal y como aparece representado en la tabla 1. Destacar que los porcentajes de glicerol, carvacrol, 2-feniletanol, NWQ y glicerol es calculado sobre la cantidad de componente base (quitosano o WPI) que se adiciona.

Tabla 1. Diseño experimental de las películas

Q (1% w/w) + Glicerol (15% w/w)			
	CARV (1% w/w)	2-FOH (10% w/w)	Sin agente antimicrobiano
NWQ (% w/w)	0	0	0
	1,5	1,5	1,5
	3	3	3
WPI (10% w/w) + Glicerol (50% w/w)			
	CARV (1% w/w)	2-FOH (10% w/w)	Sin agente antimicrobiano
NWQ (% w/w)	0	0	0
	1,5	1,5	1,5
	3	3	3

*nanopartículas de quitina

Para cada una de las muestras elaboradas se realiza la caracterización de las propiedades fisicoquímicas (humedad, espesor y opacidad), las propiedades tecnológicas (propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua) y las propiedades antimicrobianas.

3. Materiales y método

3.1. Materiales utilizados

3.1.1. Componentes utilizados en la elaboración de las películas

- **Quitano:** las películas elaboradas en base a quitano obtenido del caparazón de camarones boreales con un grado de desacetilación del 95% y una viscosidad de 21cP. En la tabla 3 aparecen los parámetros del quitano utilizado.

Tabla 2. Parámetros del quitano utilizado en la elaboración de las películas

Parámetro	Resultado
Grado de desacetilación	95%
Viscosidad	21cP (mPa/s)
Materia seca	94%
Solubilidad	99.1%
Turbidez	17 NTU
Cenizas	0.9%



Figura 4. Quitano empleado en la elaboración de los films de quitano.

- **WPI:** las películas desarrolladas en base a proteína de suero lácteo fueron proporcionadas por Davisco Foods International. En la tabla 4 se ven representados los parámetros de la proteína empleada.

Tabla 3. Composición química del aislado de proteína de suero lácteo utilizado

Parámetro	Valor
Proteína	90.0 – 92.0
Lactosa	0.5 – 1.0
Grasa	0.5 – 1.0
Cenizas	2.0 – 3.0
Humedad	4.5

- **Nanopartículas de quitina:** las nanopartículas fueron suministradas por el equipo de investigación del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del CSIC en Madrid.



Figura 5. Nanopartículas de quitina empleadas en la elaboración de las películas.

- **Carvacrol:** carvacrol $\leq 98\%$ suministrado por Sigma Aldrich Co. Las características de este compuesto se ven reflejadas en la tabla 5.

Tabla 4. Parámetros del carvacrol utilizado en la elaboración de las películas

Parámetro	Resultado
Viscosidad	28,5000 (mPa*s)
Temperatura de inflamación	106,0000 °C
Punto de fusión	3,0000 °C
Peso molecular	150,2200 (g/mol)
Densidad	0,9756 (g/ml)

- **2-feniletanol:** 2-feniletanol $\geq 99\%$ suministrado por Sigma Aldrich Co. Las características de este compuesto se ven reflejadas en la tabla 6:

Tabla 5. Parámetros del 2-feniletanol utilizado en la elaboración de las películas.

Parámetro	Resultado
Viscosidad	7,58 (mPa*s)
Temperatura de inflamación	102,00 °C
Solubilidad en agua	17,50 g/L
Peso molecular	122,16 (g/mol)
Densidad	1,02 (g/ml)

3.1.2. Materiales auxiliares

- Agua desionizada.
- Ácido acético glacial al 99%.
- Glicerol utilizado como plastificante.
- Baño de agua con agitación para la elaboración de las películas de WPI.
- Placas Petri de 14 cm de diámetro.
- Cámara climática para secar las películas a unas condiciones determinadas de temperatura y humedad relativa.
- Guillotina de doble cizalla.
- Micrómetro digital ID-F125 Mitutoyo.
- Sales de sílica gel: utilizadas para desecar la cabina Sanplatec hasta el 0% de humedad relativa.
- Cabina Sanplatec al 0% de humedad relativa para los ensayos de permeabilidad al vapor de agua.
- Células de metacrilato.
- Cabina a humedad controlada al 57%.
- Agitador magnético.
- Equipo de ultrasonidos Hielscher UP400S.
- Texturómetro, Texture Analyzer TA-XTZi.
- Estufa a 150 °C para la activación de las sales de sílica gel y a 105 °C para el ensayo de humedad.
- Espectrofotómetro Hitachi UH5300.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de las películas

❖ *Elaboración de films control de quitosano (Q)*

En la elaboración de films de quitosano se utiliza un 1% (w/w) de quitosano junto con un 1% (w/w) de ácido acético y un 15% (w/w con respecto al quitosano) de glicerol para un volumen de 300 ml. Una vez pesadas las cantidades de quitosano, ácido acético y agua desionizada (tal y como aparece en la tabla 6) se agita en una placa agitadora durante 30 minutos tapando los vasos con papel de aluminio para que no se contaminen. Pasados estos 30 minutos se sónica durante 10 minutos a 450 W en el equipo de ultrasonidos. Es importante colocar hielo puesto que la disolución no se ha de sobrecalentar. Previo a la utilización del equipo de ultrasonidos se debe limpiar con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.

Pasados los 30 minutos se añade, con una pipeta Pasteur, el 15% (w/w con respecto al quitosano) de glicerol. Se deja la disolución agitando durante 24 horas sobre la placa agitadora para conseguir que el glicerol se disperse completamente. Se tapa con papel de aluminio para evitar contaminaciones.

Tras las 24 horas en agitación se vuelve a someter a la disolución a ultrasonidos durante 10 minutos para eliminar el aire que se haya incluido en la solución debido a la agitación. Se vierten 81 g de la solución formadora en placas Petri con una micropipeta de 20 ml y se someten a 45 °C y un 50% de humedad relativa durante 36 horas en la cámara climática. Las placas se colocan en una superficie nivelada para favorecer el secado.

Tabla 6. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano.

Q (g)	Agua (g)	Ácido acético (g)	Glicerol (g)
3,000	293,550	3,000	0,450

❖ *Elaboración de films de quitosano y nanopartículas de quitina (Q_NWQ1.5//Q_NWQ3)*

Para la elaboración de los films de quitosano 1% (w/w) con nanopartículas de quitosano a diferentes concentraciones (1,5% y 3% w/w quitosano) en una solución de ácido acético al 1% (w/w) para un volumen de 300 ml. Las cantidades adicionadas aparecen representadas en la tabla 7. Al igual que en la formación de las películas de quitosano se agitan durante 30 minutos, se sonicán a 450 W durante 10 minutos y se adiciona el glicerol. Se agita durante 24 horas para la correcta dispersión de las nanopartículas de quitina y se sónica durante 10 minutos a 450 W y, finalmente, se vierte la solución formadora de films al igual que en la anterior elaboración.

Tabla 7. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano y nanopartículas de quitina

Q (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Ácido acético (g)	Glicerol (g)
3,000	293,550	0,045	3,000	0,450
		0,090		

❖ *Elaboración de films de quitosano, nanopartículas de quitina y carvacrol (Q_NWQ1.5_CARV//Q_NWQ3_CARV)*

Se elaboran films de quitosano al 1% (w/w) con nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones en una disolución de ácido acético al 1% (w/w) para un volumen de 300 ml y un 1% carvacrol (w/w) frente al peso de quitosano. Para esto se pesa el quitosano, nanopartículas de quitina, el agua desionizada y el ácido acético y se sigue el mismo procedimiento que el explicado en la elaboración anterior hasta el final de la agitación de 24 horas. El carvacrol se adiciona, pasadas las 24 horas de agitación, con ayuda de una pipeta. Se deja la solución formadora de films en agitación durante 15 minutos para favorecer la dispersión de este y, finalmente, se sónica a máxima potencia durante 10 minutos. Se vierte en placas tal y como se ha explicado anteriormente.

Tabla 8. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano, nanopartículas de quitina y carvacrol.

Q (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Ácido acético (g)	Glicerol (g)	CARV (g)
3,000	293,550	0,000	3,000	0,450	0,030
		0,045			
		0,090			

❖ *Elaboración de films de quitosano, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol (Q_NWQ1.5_2FOH//Q_NWQ3_2FOH)*

Se elaboran films de quitosano al 1% (w/w) con nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones en una disolución de ácido acético al 1% (w/w) para un

volumen de 300 ml y un 10% de 2-feniletanol (w/w) frente al peso de quitosano. Para esto se pesa el quitosano, nanopartículas de quitina, el agua desionizada y el ácido acético y se sigue el mismo procedimiento que el explicado en la elaboración anterior hasta el final de la agitación de 24 horas. El 2-feniletanol se adiciona, pasado el periodo de agitación de 24 horas de agitación, con ayuda de una pipeta. Se deja la solución formadora de films en agitación durante 15 minutos para favorecer la dispersión de este y, finalmente, se sónica a máxima potencia durante 10 minutos. Se vierte en placas tal y como se ha explicado anteriormente.

Tabla 9. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol.

Q (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Ácido acético (g)	Glicerol (g)	2FOH (g)
3,000	293,550	0,000	3,000	0,450	0,300
		0,045			
		0,090			

❖ ***Elaboración de films control de WPI (WPI)***

En la elaboración de films control de WPI se utiliza un 10% (w/w) de proteína de suero lácteo (WPI) junto con un 50% (w/w con respecto al WPI) de glicerol para un volumen de 100 ml. Una vez pesadas las cantidades de WPI, glicerol y agua desionizada (tal y como aparece en la tabla 10) se agita en una placa agitadora durante 30 minutos tapando los vasos con papel de aluminio para que no se contaminen. Pasados estos 30 minutos introducen en un baño térmico a 90 °C durante 30 minutos y se dejan enfriar hasta los 40 °C. Una vez la solución se ha enfriado se sónica durante 1 minuto a 450 W en el equipo de ultrasonidos. Es importante colocar hielo puesto que la disolución no se ha de sobrecalentar. Previo a la utilización del equipo de ultrasonidos se debe limpiar con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.

Tabla 10. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI.

WPI (g)	Agua (g)	Glicerol (g)
10,0	85,0	5,0

Una vez sometido a ultrasonidos la disolución, con ayuda de una micropipeta de 20 ml, se añaden 14 g de disolución sobre las tapas de las placas Petri. Se introducen estas en la cámara climática a 40 °C y 45% HR durante 18-24 horas.

❖ ***Elaboración de films de WPI y nanopartículas de quitina (WPI_NWQ1.5//WPI_NWQ3)***

En la elaboración de films de WPI y nanopartículas se utiliza un 10% (w/w) de proteína de suero lácteo (WPI) junto con un 50% (w/w con respecto al WPI) de glicerol para un volumen de 100 ml. Una vez pesadas las cantidades de WPI, glicerol y agua desionizada (tal y como aparece en la tabla 11) se agita en una placa agitadora durante 30 minutos tapando los vasos con papel de aluminio para que no se contaminen. Pasados estos 30 minutos introducen en un baño térmico a 90 °C durante 30 minutos y se dejan enfriar hasta los 40 °C. Una vez la solución se ha enfriado se adicionan las nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones (1,5% y 3% w/w WPI) y se sónica durante 1 minuto a 450 W en el equipo de ultrasonidos. Es importante colocar hielo puesto que la disolución no se ha de sobrecalentar. Previo a la utilización del

equipo de ultrasonidos se debe limpiar con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.

Tabla 11. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WP y nanopartículas de quitina.

WPI (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Glicerol (g)
10,00	85,00	0,15	5,00
		0,30	

Una vez sometido a ultrasonidos la disolución, con ayuda de una micropipeta de 20 ml, se añaden 14 g de disolución sobre las tapas de las placas Petri. Se introducen estas en la cámara climática a 40 °C y 45% HR durante 18-24 horas.

❖ **Elaboración de films de WPI, nanopartículas de quitina y carvacrol (WPI_NWQ1.5_CARV//WPI_NWQ3_CARV)**

En la elaboración de films de WPI con NWQ y carvacrol se utiliza un 10% (w/w) de proteína de suero lácteo (WPI) junto con un 50% (w/w con respecto al WPI) de glicerol para un volumen de 100 ml. Una vez pesadas las cantidades de WPI, glicerol y agua desionizada (tal y como aparece en la tabla 12) se agita en una placa agitadora durante 30 minutos tapando los vasos con papel de aluminio para que no se contaminen. Pasados estos 30 minutos introducen en un baño térmico a 90 °C durante 30 minutos y se dejan enfriar hasta los 40 °C. Una vez la solución se ha enfriado se adicionan las nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones (1,5% y 3,0% w/w WPI) y el carvacrol al 1% (w/w) frente al peso de WPI y se sónica durante 1 minuto a 450 W en el equipo de ultrasonidos. Es importante colocar hielo puesto que la disolución no se ha de sobrecalentar. Previo a la utilización del equipo de ultrasonidos se debe limpiar con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.

Tabla 12. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI, nanopartículas de quitina y carvacrol.

WPI (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Glicerol (g)	CARV (g)
10,00	85,00	0,00	5,00	0,10
		0,15		
		0,30		

❖ **Elaboración de films de WPI, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol (WPI_NWQ1.5_2FOH//WPI_NWQ3_2FOH)**

En la elaboración de films de WPI, NWQ y 2FOH se utiliza un 10% (w/w) de proteína de suero lácteo (WPI) junto con un 50% (w/w con respecto al WPI) de glicerol para un volumen de 100 ml. Una vez pesadas las cantidades de WPI, glicerol y agua desionizada (tal y como aparece en la tabla 13) se agita en una placa agitadora durante 30 minutos tapando los vasos con papel de aluminio para que no se contaminen. Pasados estos 30 minutos introducen en un baño térmico a 90 °C durante 30 minutos y se dejan enfriar hasta los 40 °C. Una vez la solución se ha enfriado se adicionan las nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones (1,5% y 3,0% w/w WPI) y el 2-feniletanol al 10% (w/w) frente al peso de WPI y se sónica durante 1 minuto a 450 W en el equipo de ultrasonidos. Es importante colocar hielo puesto que la disolución no se ha de sobrecalentar. Previo a la utilización del equipo de ultrasonidos se debe limpiar con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.

Tabla 13. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de WPI, nanopartículas de quitina y 2-feniletanol.

WPI (g)	Agua (g)	NWQ (g)	Glicerol (g)	2FOH (g)
10,00	85,00	0,00	5,00	1,00
		0,15		
		0,30		

3.2.2. Caracterización del tamaño de partícula de las soluciones formadoras de films

La determinación del tamaño de partícula se realiza mediante el equipo Mastersizer 3000, en adelante MS3000. El MS3000 es un equipo que permite determinar el tamaño medio y la distribución del tamaño de partículas en suspensión líquida en el rango de 0,01 a 3500 μm . Este equipo trabaja mediante la técnica de difracción láser que consiste en que un haz de rayos láser que atraviesan la solución acuosa en movimiento e interactúa con ella produciendo una dispersión analizada por fotodiodos. El patrón de dispersión generado depende, entre otras cosas, del tamaño de partícula con la que choca el rayo láser. De esta manera las partículas grandes producen mucha dispersión de la energía incidente con ángulos bajos de dispersión mientras que las partículas pequeñas producen poca dispersión, pero con ángulos altos de dispersión de la luz.

El equipo MS3000 dispone de dos fuentes de luz para poder cubrir el amplio rango de tamaño de partículas existente entre 10 nm y 3,5 mm:

- Para cubrir el rango de partículas más pequeñas dispone de una fuente principal de luz láser He-Ne de color rojo (633 nm) y los detectores nº 1 a 51 (este último es el Detector de Extinción de la luz roja).
- Para cubrir el rango de partículas más grandes, dispone de una fuente secundaria de láser diodo de color azul (470 nm) y los detectores nº 52 a 63 (éste último, Detector de Extinción de la luz azul).

La información proporcionada por el equipo es en forma de histograma donde los detectores de número más bajo corresponden a partículas más pequeñas y los detectores de número más alto corresponden a las partículas más grandes.

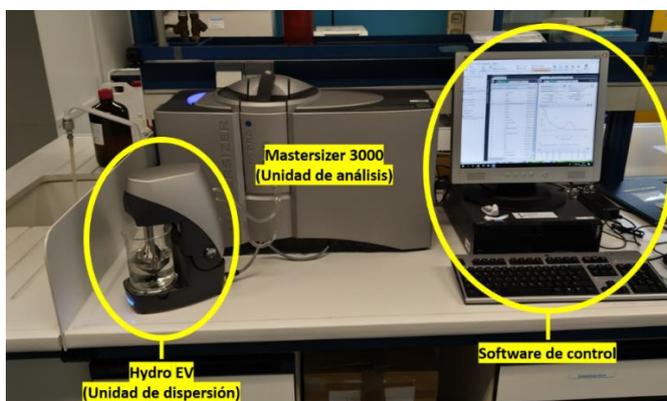


Figura 6. Unidad de análisis (MS3000), unidad de dispersión (Hydro EV) y PC con el software de control y análisis de resultados (Malvern 3.81).

En la figura 6 aparece representado el MS3000 junto con la unidad de dispersión, Hydro EV, que mantiene la muestra dispersa en un volumen determinado de disolución

mientras recorre el circuito cerrado impulsado por una turbina de agitación con una velocidad de 0-3500 rpm. Para que la sustancia que se va a estudiar esté bien dispersada la turbina también dispone de un sistema adicional de ultrasonido.

Para la utilización del equipo se deben de seguir los siguientes pasos:

1. Encender el MS3000 y dejar que el sistema se caliente durante, al menos, 30 minutos. Esto permite que el láser He-Ne se estabilice y proporcione una potencia constante asegurando así la consistencia de las medidas.
2. Preparación de las muestras cuyo dispersante, en este caso agua con un 1% de ácido acético, deberá de estar atemperado y desgasificado dejándolo recircular en el equipo el tiempo suficiente.
3. Creación del fichero donde se almacenarán los datos (menú/abrir/fichero).
4. Ejecutar una medida manual o un standard operation procedure. En el caso de que la medida sea manual se configura la medida siguiendo los siguientes pasos:
 - a. Identificar la muestra.
 - b. Seleccionar el tipo de partícula: no esférica, esférica o tipo Fraunhofer.
 - c. Características ópticas críticas del material dispersado: se tienen que introducir los índices de refracción y absorción de luz roja y luz azul seleccionándolos del listado desplegable.
 - d. Seleccionar el índice de refracción del dispersante del listado desplegable.
 - e. Especificar la duración de la medición con la luz roja y azul (entre 5 y 15 segundos).
 - f. Especificar el rango mínimo y máximo de obscuración, en este caso por el tamaño de partícula a analizar, se busca una obscuración aproximada del 3%.
 - g. Configuración de la unidad de dispersión: velocidad de agitación y activación de ultrasonidos.
5. Para ejecutar la medida se siguen los siguientes pasos:
 - a. Inicializar/alinear el instrumento, el equipo alinea los detectores del sistema.
 - b. Medición del fondo: se mide la señal de los detectores haciendo pasar la fase dispersante sin muestra.
 - i. Antes de medir el fondo se ha de asegurar que la potencia del láser está en la zona verde en la pantalla (>50%).
 - ii. Tras la medida de fondo la barra vertical pasa a llamarse obscuración y debe de indicar un valor próximo a 0% debiendo mostrar la señal un ruido aleatorio de bajo nivel en cualquiera de los detectores.
 - c. Medición de la muestra: se añade la muestra a la fase dispersante y, tras alcanzar el valor de obscuración deseado de forma constante, se mide la luz incidente en cada detector.

3.2.3. Caracterización de las propiedades de los films

❖ *Espesor*

La medida del **espesor** se realiza con un micrómetro digital, figura 7, con una precisión de 1 µm y la medida se lleva a cabo en 10 puntos diferentes elegidos al azar de cada muestra.



Figura 7. Micrómetro digital (ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón)

❖ *Humedad*

El **contenido en humedad** de los films se determina mediante la pérdida de peso de las muestras equilibradas durante 5 días a 57% de humedad relativa. Se preparan 8 tiras de 2,5 × 7,5 cm que, pasados los 5 días de aclimatación, se colocan en un horno de convección a 105 °C durante 24 horas. Pasadas estas 24 horas se mide el peso y se calcula el % de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100$$

Donde P_0 es el peso inicial (antes de introducirlo en la estufa) y P_f el peso final (una vez transcurridas las 24 horas).

❖ *Opacidad*

La **opacidad** que tienen las películas se obtiene mediante la medición de la absorbancia a una determinada longitud de onda, en este caso 600 nm, mediante un espectrofotómetro (UH5300, Hitachi, Japón).



Figura 8. Espectrofotómetro utilizado para la medida de opacidad de los films (UH5300, Hitachi, Japón).

La determinación de la opacidad se obtienen 3 tiras de $1,2 \times 4,0$ cm. Antes de realizar las medidas de absorbancia se hace una medida en la que se utiliza el aire como referencia o blanco. Una vez realizada esta medida se colocan las tiras en el portacubeta y se cierra la tapa, se mide la absorbancia realizando 3 medidas para cada tira. Una vez obtenida la medida de absorbancia se calcula la opacidad según la siguiente medida:

$$Opacidad = \frac{A_{600}}{X}$$

$$Opacidad = \frac{A_{600}}{X}$$

Dónde:

- A_{600} es la absorbancia resultante a una longitud de onda de 600 nm.
- X es el espesor en mm.

❖ **Propiedades mecánicas**

Para la caracterización de las propiedades mecánicas se utiliza la Norma ATSM D882, 2000. El dispositivo empleado para los ensayos de tracción es el texturómetro *Texture Analyzeer TA-XTZi* junto con el programa *Texture Expert Exceed*. Se emplean las condiciones establecidas en la tabla 14 con una distancia inicial entre pinzas de 50 mm. Con este ensayo se consiguen valores de **Tensión máxima** y **Elongación de rotura** que permiten la comparación de las muestras según la resistencia y la flexibilidad respectivamente.

Tabla 14. Parámetros del ensayo para las propiedades mecánicas.

Velocidad ensayo	0,80 mm/s
Velocidad post-ensayo	5,00 mm/s
Ensayo de ruptura	4,00 mm
Distancia	250,00 mm
Sensibilidad de rotura	0,20 N
Trigger	0,05 N

Para llevar a cabo el ensayo se preparan 10 tiras de $2,5 \times 7,5$ cm y se equilibran al 57% de humedad relativa durante 7 días en una cabina con sales de bromuro de sodio (NaBr). Antes de realizar el ensayo se mide el área, la sección, espesor y gramaje de cada una de las 10 tiras. Tras realizar estas medidas se realiza la prueba y se obtienen los gráficos de la fuerza (N) frente a la distancia (mm). Para obtener los parámetros que interesan se tienen en cuenta las siguientes relaciones:

$$Sección = anchura \times espesor [mm^2]$$

$$Área = anchura \times longitud [mm^2]$$

$$Gramaje = \frac{peso}{\text{área}} \left[\frac{g}{m^2} \right]$$

$$Tensión\ máxima = \frac{fuerza\ máxima}{sección} \left[\frac{N}{mm^2} \right]$$

$$Elongación\ relativa\ (\%) = \frac{elongación\ máxima}{separación\ entre\ las\ pinzas} \times 100$$

❖ *Permeabilidad al vapor de agua*

La permeabilidad al vapor de agua (*Water Vapor Permeability, WVP*) es una medida que indica la facilidad con la que un material deja traspasar el vapor de agua. Antes de realizar el experimento se ponen las sales de sílica gel en una estufa a 150 °C durante 24 horas para introducirlas en la cabina Sanplatec, figura 9, durante 24 horas para que, una vez encendido el ventilador, se aclimate al 0% de humedad relativa. El ventilador consigue que el aire se mueva a 150 m/min manteniendo unas condiciones de ensayo uniformes en todos los puntos de la cabina.



Figura 9. Cabina Sanplatec utilizada para el ensayo de permeabilidad al vapor de agua.

Para el ensayo se preparan 5 discos de muestra de 8 cm de diámetro y se mide el espesor mediante el micrómetro digital. A continuación, se dispensan 6 ml de agua desionizada en la célula de metacrilato y se pone el film, de manera cuidadosa para que el film no se moje, y se atornilla la tapa. Se pesa en la balanza el sistema ya montado y se introduce en la cabina Sanplatec aclimatada al 0% de HR y 25 °C. Se realizarán un total de 5 medidas en intervalos de 2 horas.

Para el cálculo de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se tiene que determinar en primer lugar la WVTR y la permeación según las siguientes ecuaciones:

$$WVTR = \frac{\text{pérdida de agua}}{t \times \text{área}} \left[\frac{g}{h \times m^2} \right]$$

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{P_{A1} - P_{A2}} \left[\frac{g}{h \times m^2 \times KPa} \right]$$

$$\text{Permeabilidad} = WVTR \times \text{Permeación} \left[\frac{g}{h \times m^2 \times KPa} \right]$$

Es importante a la hora de realizar los cálculos tener en cuenta el gradiente de humedades entre uno y otro lado de la película ya que esta regulará la transferencia de vapor de agua de la cara interna hacia la externa. Así pues, P_{A2} , presión parcial por encima del film, se considera 0 por la adición de las sales desecantes y la renovación del aire por el ventilador. La cara interna del film es la que queda expuesta a una humedad relativa del 100% y la cara externa al 0%.

3.2.4. Caracterización de las propiedades antimicrobianas

Para la caracterización de las propiedades antimicrobianas se parten de crioviales con los diferentes microorganismos ya preparados. Los microorganismos con los que se va a hacer el ensayo aparecen indicados en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones óptimas de crecimiento para cada bacteria.

Cepa	Cód. CECT	Medio de cultivo	Incubación	Atmósfera
<i>E. coli</i>	45	Mueller Hinton (MH)	37°C 24h	Aerobiosis
<i>S. aureus</i>	86	Nutrient Broth I (NBI)	37°C 24h	Aerobiosis
<i>P. fragi</i>	446	Nutrient Broth I (NBI)	26°C 24h	Aerobiosis
<i>L. innocua</i>	910	Brain Heart Infusion (BHI)	37°C 24H	Aerobiosis

Para el ensayo se deben de preparar con anterioridad los siguientes materiales:

- Placas Petri con cada uno de los medios especificados en la tabla 15 para cada microorganismo. Se preparan siguiendo las especificaciones del envase y se diluirán mediante agitación y calor y se autoclavarán.
- Tubos eppendorf con 0,9 mL de medio de cultivo estériles.
- Medio de cultivo estéril (NBI y BHI).
- Tubos eppendorf estériles.
- Puntas de 200 µL estériles.
- Puntas de 1000 µL estériles.
- Muestras de los films a testar.

El ensayo se llevará a cabo en tres días.

Día 1: a partir de los crioviales se lanzan los cultivos en 2 placas de cada una de las cepas que se van a testar. Se pipetea 100 µL de la muestra del criovial y se cultivan durante 24 horas a 37 o 26 °C (el en caso de *Pseudomonas fragi*).

Día 2: se recuperan los cultivos y se transfieren a tubos de 10 mL de medio de cultivo líquido hasta alcanzar una densidad óptica de 1 a $\lambda = 600$ nm. A continuación, se inoculan 100 µL de cultivo en cada placa y se siembran en césped empleando asas de siembra en L. Una vez se seque el cultivo se añaden los discos de los films de 1,7 cm de diámetro. Las muestras serán analizadas por triplicado. Las placas con el cultivo y el film serán incubadas durante 24 horas a la temperatura de crecimiento óptimo para el microorganismo testado. Para finalizar el día 2 se realizarán 6 diluciones del cultivo inicial en tubos de medio líquido y se siembran las últimas 3 diluciones en dos placas cada una y se incuban durante 24 horas a temperatura de crecimiento óptimo.

Día 3: se miden los halos de inhibición con una regla y se calcula la superficie de inhibición excluyendo la superficie del film. Se hacen los recuentos de las placas del cultivo inicial con el que se inoculan las placas siguiendo la siguiente ecuación:

$$Carga\ microbiana = \frac{recuento \times DF}{volumen} \left[\frac{ufc}{mL} \right]$$

Siendo:

- Recuento: promedio de las colonias observadas en dos placas viables de la misma dilución.
- DF: factor de dilución.
- Volumen: volumen de siembra en mL, habitualmente es 0,1.

3.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realiza con el programa informático Statgraphics Centurion 18 X64. Se analizan los datos obtenidos en las pruebas de espesor, humedad, opacidad, tracción (tensión máxima de rotura y elongación relativa), permeabilidad al vapor de agua e inhibición microbiana.

Los factores estudiados fueron la concentración de nanopartículas, la presencia de carvacrol y 2-feniletanol así como las diferentes bases (quitosano y WPI) entre sí con la finalidad de conocer si existen diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

En el análisis estadístico se compararán las variables comparando las formulaciones con su control, es decir, en el caso de las soluciones formadores que solo contienen nanopartículas se compararán con su control con solo la base ya sea quitosano o WPI. Las soluciones que contienen tanto nanopartículas como agentes antimicrobianos serán comparadas con, las muestras sin agentes antimicrobianos y con las formulaciones base.

4. Resultados

4.1. Apariencia de los films

Tanto los films de WPI como los films de quitosano resultaron transparentes con una ligera coloración amarilla más intensa en el caso de estos últimos. De la misma manera los films de quitosano, como se puede observar en la figura 10, son más homogéneos y menos rugosos que los de WPI. Cabe destacar que con la adición de los agentes antimicrobianos no se da una diferencia en la coloración de estos films.

Todas las formulaciones llevadas a cabo se pudieron despegar con facilidad de las placas Petri si bien es cierto que las de quitosano se despegaron con mayor facilidad que las de WPI.

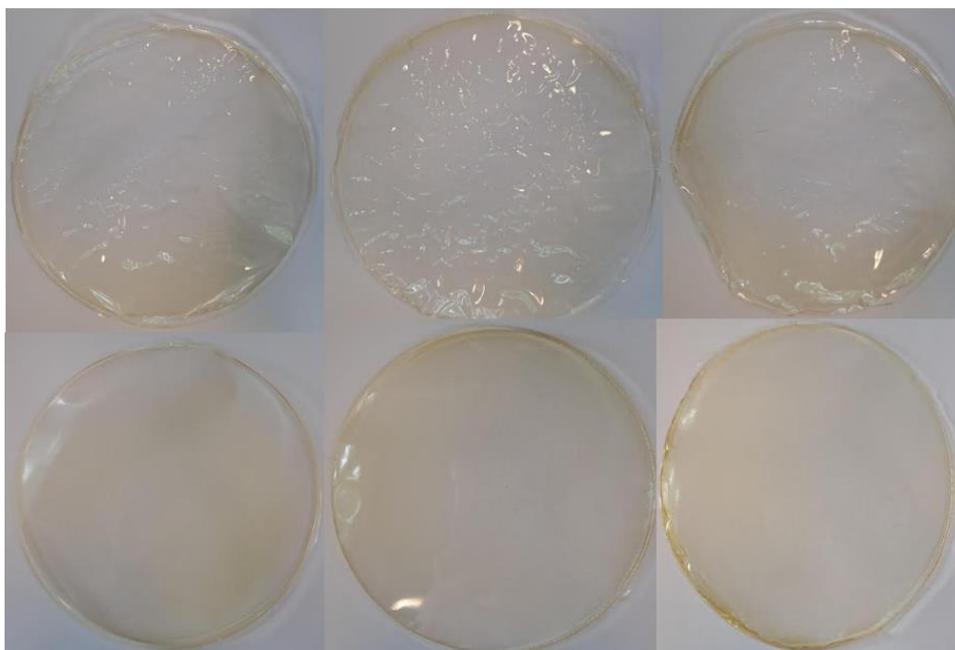


Figura 10. Apariencia de alguna de las diferentes películas despegadas. En la primera fila se pueden apreciar las formulaciones de WPI, WPI_NWQ1.5_CARV y WPI_NWQ3_2FOH y, en la fila de abajo las de Q, Q_NWQ1.5_CARV y Q_NWQ3_2FOH.

4.2. Tamaño de partícula de las soluciones formadoras de films

Tanto en la figura 11 como en la figura 12 se aprecian los resultados relativos al tamaño de partícula. Las gráficas con el número 1 pertenecen a los ensayos empleando agua ionizada. En las gráficas con el número dos, correspondientes al ensayo 2, se utiliza agua desionizada y un 1% de ácido acético para mantener las condiciones del pH de las soluciones formadora de los films de quitosano. Este segundo ensayo se realizó para comprobar si el pH del agente dispersante influye en la distribución de las partículas.

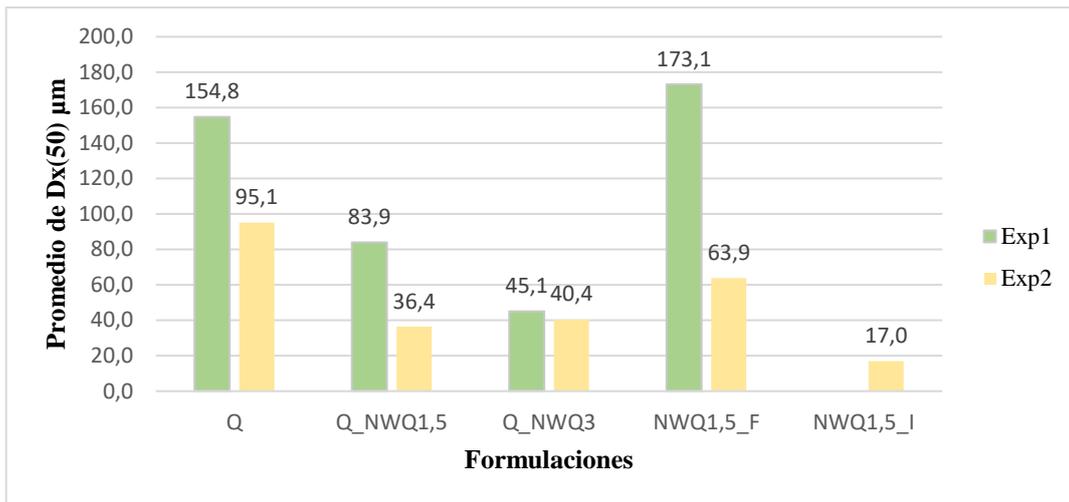


Figura 11. Resultados del promedio de Dx(50) para cada una de las formulaciones analizadas siendo el experimento 1 con agua desionizada como dispersante y el experimento 2 siendo como dispersante agua desionizada con 1% de ácido acético.

En la figura 11 se puede apreciar cómo, usando un dispersante ácido en el ensayo 2, se da una variación en cuanto a los valores medios. En el caso de la formulación que contiene las nanopartículas, en el ensayo 2, se decidió realizar una medida al inicio (NWQ1,5_I) y otra a pasados 90 minutos, al finalizar el resto de las medidas (NWQ1,5_F). En este caso, y como se ve también en la figura 11, se da un aumento en el tamaño medio de Dx (50). El efecto del pH ya ha sido estudiado anteriormente en estudios dando como resultado que, con una acidificación del medio se da una reducción en el tamaño de partícula (Ashraf et al., 2015).

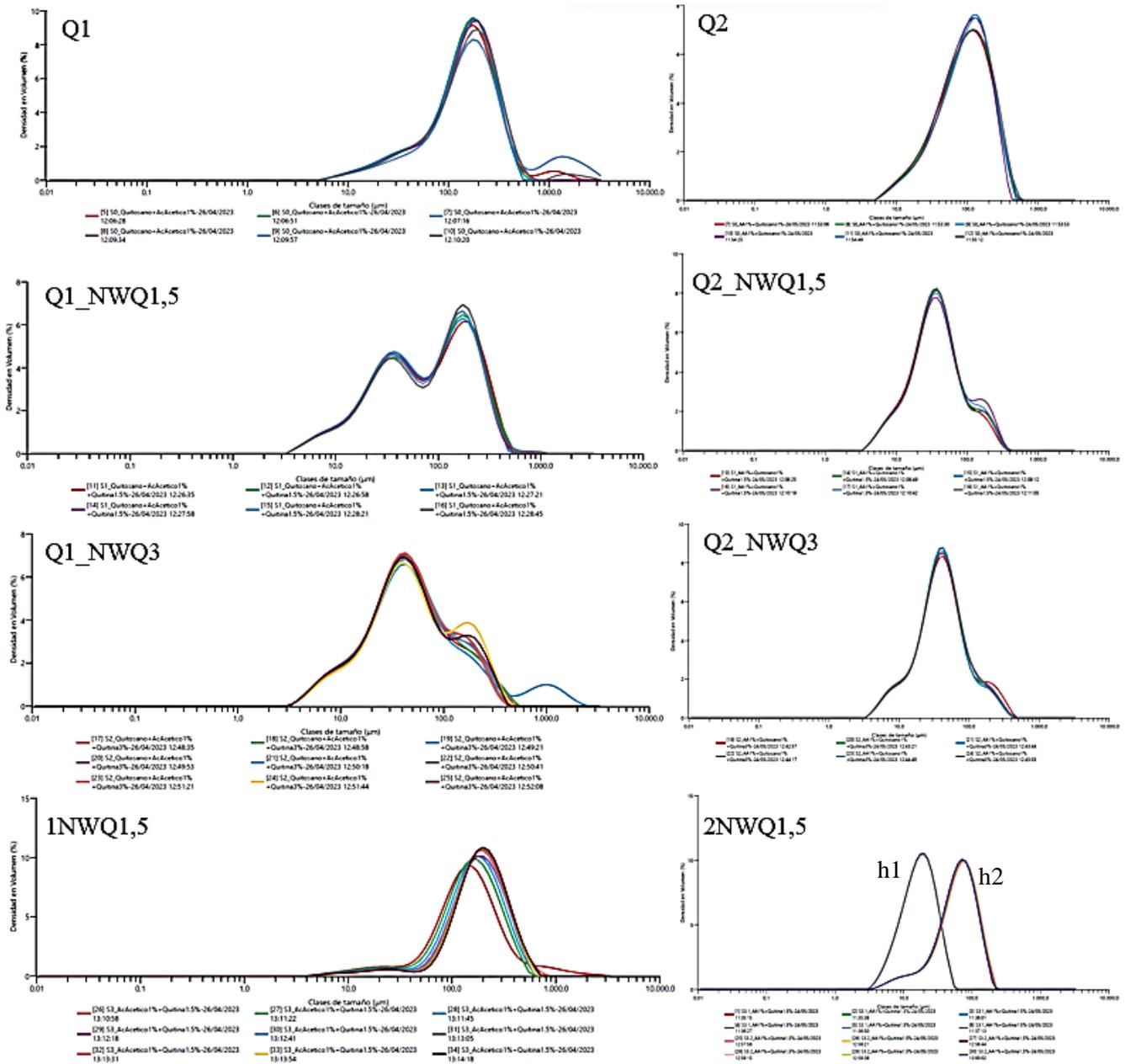


Figura 12. Representación del tamaño de partícula en función del tiempo para diferentes disoluciones formadoras de films: Q, Q_NWQ1,5, Q_NWQ3, disolución un 1,5% de NWQ. Los ensayos con el número 2 se hicieron con dispersante con un 1% de ácido acético frente a los que tienen el 1 con dispersante agua desionizada.

Como se puede observar, en la figura 12, con la adición de las nanopartículas (Q_NWQ1,5 y Q_NWQ3) la distribución de las partículas se desplaza hacia un menor tamaño de esta con respecto a la formulación sin nanopartículas (Q). En cuanto a los casos que únicamente tienen nanopartículas y no quitosano (NWQ1,5) cabe destacar que, en el primer ensayo realizado con agua desionizada (1NWQ1,5) como dispersante se puede apreciar que, con el paso de unos pocos minutos la medida se desplaza hacia tamaños de partícula mayores sugiriendo una posible coalescencia del compuesto. En el caso del ensayo realizado con la disolución acuosa con ácido acético (2NWQ1,5) se puede observar una mayor estabilidad en la medición si bien es cierto que visto el comportamiento del primer ensayo se decidió realizar dos medidas de la misma muestra. En estas dos medidas se puede observar un desplazamiento de la distribución hacia un mayor tamaño de partícula (h1 se corresponde con la medición a tiempo 0 minutos y h2 la segunda medida tras 90 minutos).

4.3. Opacidad

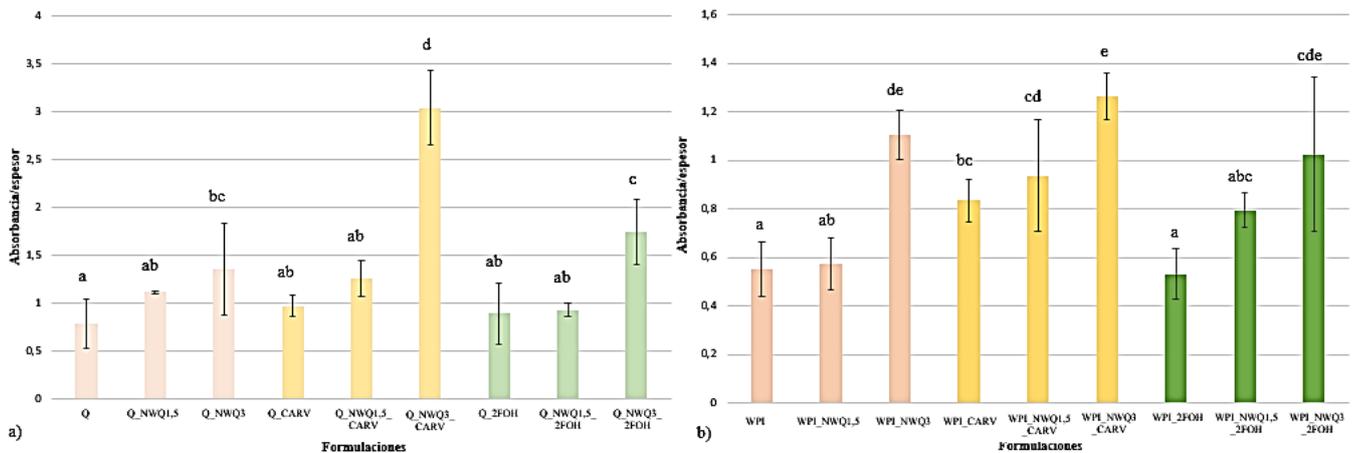


Figura 13. Valores medios de opacidad en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

Como se puede observar en la figura 13, el valor de opacidad aumenta conforme aumenta la concentración de nanopartículas de quitina. Esto se ve reflejado tanto para la formulación de quitosano (a) como para la de WPI. Cabe destacar que, aunque se ve esta tendencia, las formulaciones que contienen quitosano tienen unos valores de opacidad mayores que los de WPI. Si bien es cierto que la F1 para cada tipo de base (Q y WPI) da un valor alrededor de 0,5. Para saber si hay diferencias significativas entre las formulaciones con diferentes bases se realiza un ANOVA simple a un nivel de confianza del 95% dando como resultado que, para ambas formulaciones base existen diferencias significativas para aquellas que tienen una adición del 3% de nanopartículas de quitina. Cabe destacar que, con estos resultados se puede observar que, con la adición de los agentes antimicrobianos no se observan diferencias significativas en los valores de opacidad.

4.4. Contenido de humedad

En la figura 14 aparece representado el porcentaje de humedad que presentan las muestras tanto con base de quitosano (a) como con base de WPI. Como se puede apreciar las formulaciones realizadas con WPI tienen unos valores de % de humedad más elevados que los de quitosano ya que el WPI tiene naturaleza hidrófila que favorece la absorción de humedad (Ramos et al., 2012). Cabe destacar que, con la adición de los agentes antimicrobianos, se ve un aumento de los valores. Este efecto ha sido ya reportado en otros estudios, (Abdollahi et al., 2012; Aghayan et al., 2020), que recalcan que el aumento en el % de humedad puede ser debido a una ruptura en la red de la película.

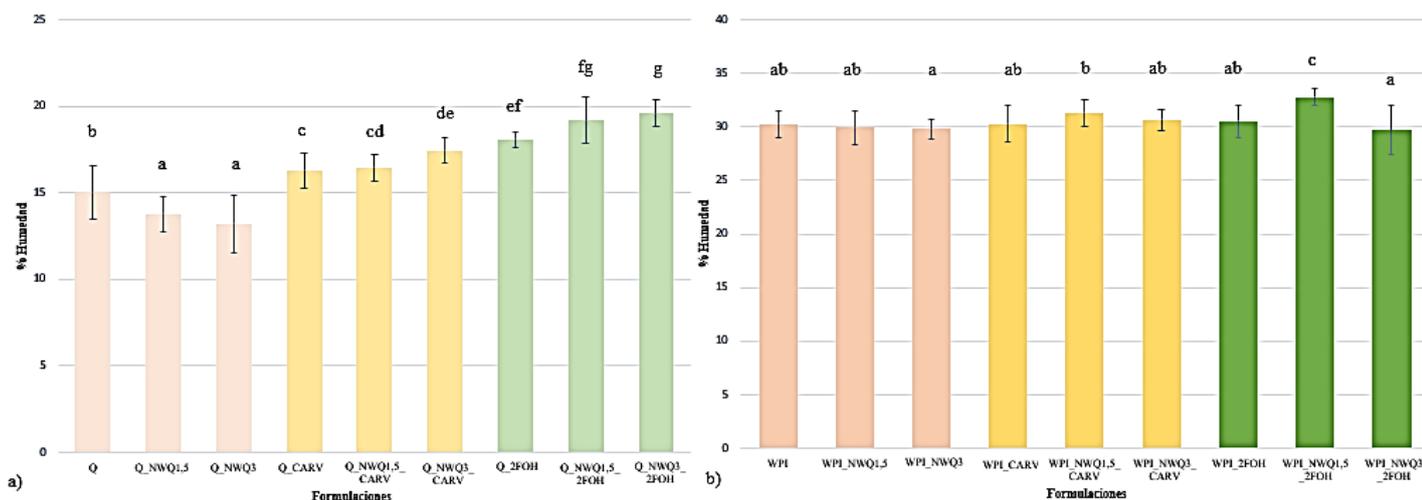


Figura 14. Valores medios de humedad en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

Para poder asegurar si hay diferencias significativas entre las formulaciones con respecto al porcentaje de humedad se realiza un análisis ANOVA simple a un nivel de confianza del 95%. Según los resultados obtenidos se puede observar que, en el caso de las formulaciones basadas en quitosano presentan diferencias significativas entre los bloques de sin agente antimicrobiano (naranja) con los de carvacrol (amarillo) y 2-feniletanol (verde). Sin embargo, en la formulación con base de WPI no se parecían grandes diferencias exceptuando la formulación WPI_NWQ1,5_CARV y la de WPI_NWQ1,5_2FOH.

4.5. Permeabilidad al vapor de agua

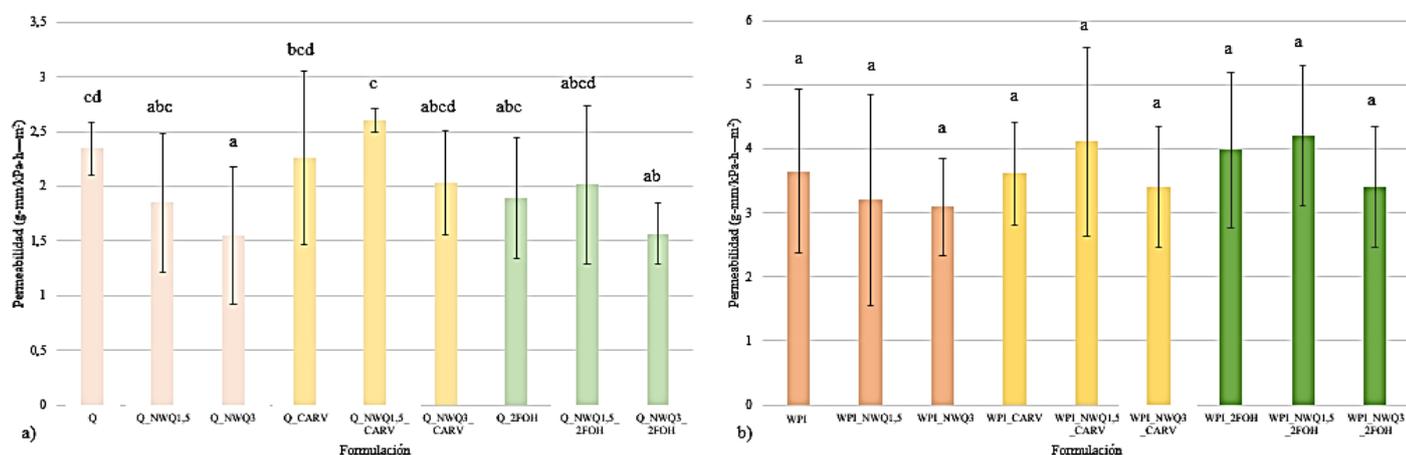


Figura 15. Valores medios de WVP en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

En la figura 15 aparecen representados los valores medios de permeabilidad al vapor de agua (WVP). En el caso de la formulación base de quitosano (Q) el valor medio se encuentra en 2,34 g-mm/kPa-h-m² y el valor medio de la formulación base de WPI (WPI) es de 3,65 g-mm/kPa-h-m². A este tipo de films se les suelen añadir agentes para mejorar los valores de permeabilidad puesto que, debido a la naturaleza hidrófila de los componentes, son mala barrera frente al vapor de agua. Se realiza un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95% para comprobar si existen diferencias significativas

tanto para la adición de nanopartículas de quitina como con la adición de los dos agentes antimicrobianos.

Como se puede observar para ambas bases con la adición de nanopartículas el valor de permeabilidad disminuye con respecto a la base, aunque únicamente se muestran diferencias significativas en el caso del quitosano. Así pues, en el caso de las formulaciones basadas, con un 3% de nanopartículas, se reduce hasta conseguir un valor medio de 3,09 g-mm/kPa-h-m² y, para la formulación de quitosano junto con el 3% de nanopartículas hasta un valor medio de 1,55 g-mm/kPa-h-m².

Sin embargo, con la adición de ambos agentes antimicrobianos se da una disminución de los valores de permeabilidad debido a que estos compuestos se introducen en la matriz de las películas dificultando el paso de las moléculas de agua (Nisar et al., 2018; Pelissari et al., 2009).

4.6. Propiedades mecánicas

En la figura 16 y 17 aparecen representados los valores medios de la tensión máxima y elongación relativa para cada una de las formulaciones con las diferentes bases. En el tratamiento de los datos se ha aplicado un análisis ANOVA simple con un nivel de confianza del 95% para así poder comprobar si existen diferencias significativas entre las diferentes formulaciones.

Tal y como se puede apreciar en la figura 16 los valores correspondientes a la formulación que contiene quitosano como componente base son superiores a los que contienen WPI como base. Esto da como resultado que, estos últimos, presenten una menor rigidez ya que la fuerza de tensión da una referencia de la integridad y durabilidad de las películas. Se puede observar cómo, en ambos casos con la adición de agentes externos bien nanopartículas como agentes antimicrobianos los valores de la tensión aumentan. Tras el análisis estadístico se ha visto que hay diferencias significativas, con respecto a la base, con un nivel de confianza al 95% exceptuando a las formulaciones Q_2FOH y Q_NWQ1,5_2FOH en el caso del quitosano y en las formulaciones que contienen 2FOH en el caso del WPI. Estas diferencias aparecen indicadas en la figura 15 con diferentes letras. El aumento de los valores de tensión se puede atribuir a las interacciones favorables entre los NWQ y el polímero y al efecto de refuerzo que se produce en la matriz de la película (Khan et al., 2012).

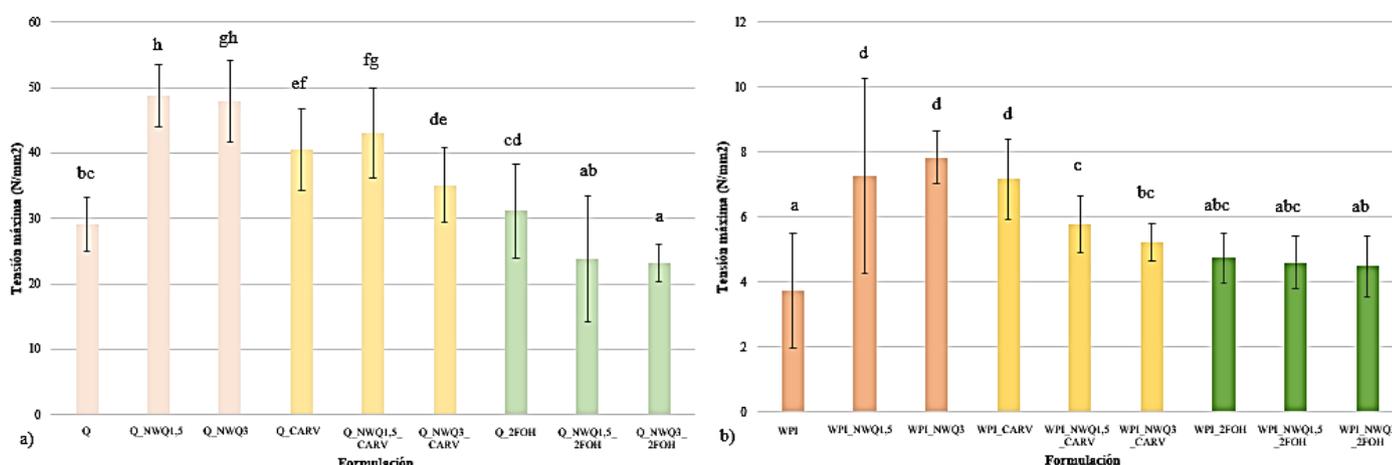


Figura 16. Valores medios de tensión máxima en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

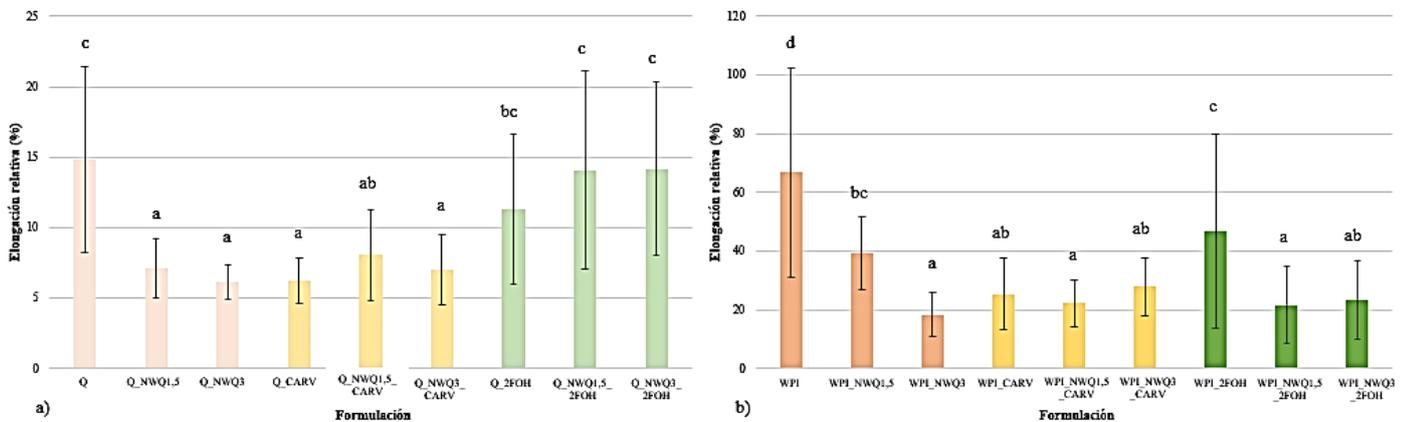


Figura 17. Valores medios de elongación relativa en las distintas formulaciones (a corresponde a las formulaciones de quitosano y b a las formulaciones de WPI). Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

La elongación relativa es un resultado que indica las propiedades de estiramiento de las películas. En la figura 17 aparecen representados los valores medios de elongación relativa en porcentaje para cada una de las formulaciones analizadas. Se puede destacar cómo con la adición de las nanopartículas los valores de elongación disminuyen para ambas formulaciones.

Con las letras que aparecen en la figura 17, se ha de remarcar que, en el caso de las formulaciones de quitosano hay diferencias significativas entre las formulaciones Q, Q_NWQ1,5_2FOH y Q_NWQ3_2FOH frente al resto. Esto indica que, frente a la formulación base sí que hay un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95% con la adición de NWQ y con la adición de NWQ y carvacrol, pero no con la adición del 2-feniletanol. En cuanto a las formulaciones con base de WPI se presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% de todas las formulaciones frente al control (WPI). La disminución de la elongación de las películas con la adición de nanocompuestos sigue la tendencia general de los compuestos poliméricos reforzados con ellos, en este caso, la adición de NWQ en la matriz polimérica restringiría el movimiento de la cadena molecular provocando esta disminución (Wu et al., 2019).

4.7. Propiedades antimicrobianas

En el ensayo de capacidad antimicrobiana se ha observado que para las formulaciones de WPI sí que se aprecia inhibición microbiana tal y como se puede apreciar en la tabla 16, en la figura 18 aparecen los resultados para algunos de los microorganismos analizados. Sin embargo, en los ensayos realizados con las películas con base en quitosano no se observó actividad antimicrobiana para ninguna de las formulaciones realizadas en ninguna de las placas cultivadas.

Tabla 16. Resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antimicrobiana para las formulaciones de WPI.

	<i>S. aureus</i>	<i>P. fragi</i>	<i>I. innocua</i>	<i>E. coli</i>
WPI	2,13±0,12 (a)	2,03±0,06 (a)	1,97±0,06 (abc)	2,10±0,10 (a)
WPI_NWQ1.5	2,07±0,06 (ab)	2,03±0,06 (a)	1,97±0,06 (abc)	2,07±0,06 (ab)
WPI_NWQ3	2,17±0,21 (a)	2,03±0,06 (a)	1,87±0,06 (d)	1,97±0,06 (cd)
WPI_CARV	2,13±0,06 (a)	2,00±0,00 (a)	1,90±0,00 (ad)	2,07±0,06 (ab)
WPI_NWQ1.5_CARV	1,97±0,06 (b)	2,00±0,00 (a)	1,87±0,10 (d)	1,93±0,06 (d)
WPI_NWQ3_CARV	1,93±0,06 (b)	1,97±0,06 (a)	1,90±0,10 (ad)	2,00±0,00 (bcd)
WPI_2FOH	2,07±0,06 (ab)	2,00±0,00 (a)	2,00±0,00 (bc)	2,10±0,00 (a)
WPI_NWQ1.5_2FOH	1,93±0,06 (b)	2,03±0,06 (a)	2,03±0,06 (c)	2,07±0,06 (ab)
WPI_NWQ3_2FOH	1,93±0,06 (b)	2,03±0,06 (a)	1,93±0,06 (abd)	2,03±0,06 (abc)

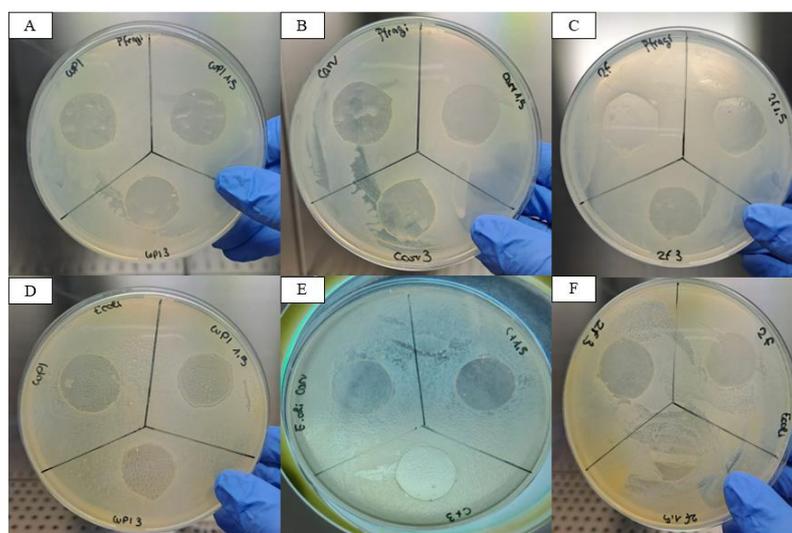


Figura 18. Resultados de inhibición microbiana en *P. fragi* (A, B, C) y *E. coli* (D, E, F) para las diferentes formulaciones siendo **AyD**: WPI, WPI_NWQ1.5 y WPI_NWQ3, **ByE**: WPI_CARV, WPI_NWQ1.5_CARV y WPI_NWQ3_CARV **CyF**: WPI_2FOH, WPI_NWQ1.5_2FOH y WPI_NWQ3_2FOH.

Así pues, teniendo en cuenta que el diámetro de los films es de 1,70 cm se puede destacar que ha habido una mayor inhibición microbiana en para *S. aureus*. Con este ensayo se pretende conocer el efecto que tienen las nanopartículas en la difusión del agente antimicrobiano. Esto queda reflejado de manera que, las formulaciones WPI, WPI_CARV y WPI_2FOH presentan mayor halo de inhibición del crecimiento microbiano que el resto de las formulaciones que tienen nanopartículas añadidas. Al realizar el análisis ANOVA simple para los diferentes microorganismos se ha visto que hay diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%, en las formulaciones que contienen nanopartículas de las que no.

Tabla 17. Resultados obtenidos en el ensayo de capacidad antimicrobiana para las formulaciones de quitosano. NA: No actividad.

	<i>S. aureus</i>	<i>P. fragi</i>	<i>I. innocua</i>	<i>E. coli</i>
Q	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ1.5	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ3	NA	NA	NA	NA
Q_CARV	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ1.5_CARV	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ3_CARV	NA	NA	NA	NA
Q_2FOH	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ1.5_2FOH	NA	NA	NA	NA
Q_NWQ3_2FOH	NA	NA	NA	NA

Para finalizar, como aparece representado en la tabla 17, no ha habido inhibición en las formulaciones de quitosano. La hipótesis planteada es que, en el proceso de elaboración de los films, los agentes antimicrobianos hayan sido degradados afectando a su capacidad antimicrobiana. Esto se debe a que estos alteran las proteínas y lípidos de la pared celular y membrana citoplasmática de los microorganismos generando un desequilibrio en la presión osmótica intracelular provocando, finalmente, la necrosis celular (Carhuallanqui Pérez et al., 2020). Lo que se cree es que, al necesitar estos films más tiempo de secado en cámara climática debido a la humedad que contienen el agente antimicrobiano se ha evaporado.

5. Conclusiones

- Se ha conseguido desarrollar protocolos de elaboración de films de quitosano con nanopartículas de quitina y carvacrol o 2-feniletanol incorporados.
- Se ha conseguido desarrollar protocolos de elaboración de films de WPI con nanopartículas de quitina y carvacrol o 2-feniletanol incorporados.
- Se han incorporado diferentes concentraciones de nanopartículas de quitina, así como diferentes agentes antimicrobianos a los films obteniéndose las siguientes conclusiones:
 - El tamaño de partícula de las disoluciones analizadas se ve influido tanto por el pH como por el tiempo. Con el tiempo las partículas se agregan dando mayores valores en el tamaño.
 - Con la adición de nanopartículas se da un aumento de la opacidad.
 - El contenido en humedad de los films con base de quitosano disminuye con la adición de nanopartículas y aumenta con la adición de los agentes antimicrobianos. En el caso de los films con base de WPI se ve esta misma tendencia, aunque más atenuado.
 - Con la adición de nanopartículas se consigue una disminución en la permeabilidad al vapor de agua tanto con agentes antimicrobiano como sin ellos para ambas bases.
 - En general con la adición de las nanopartículas aumenta la rigidez de las películas y disminuye su flexibilidad en ambas bases.
 - Se da una inhibición microbiana para las películas con base de WPI dando, diferencias significativas en la adición de nanopartículas, en todos los microorganismos exceptuando *P. fragi*. En las películas basadas en quitosano no se vio inhibición microbiana.

6. Bibliografía

- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 847-853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02917.x>
- Aghayan, N. S., Seyfi, J., Asadollahzadeh, M. J., Davachi, S. M., & Hasani, M. (2020). Developing multicomponent edible films based on chitosan, hybrid of essential oils, and nanofibers: Study on physicochemical and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4065-4072. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.034>
- Apesteuguía Izurdiaga, M. (2019). *Desarrollo y caracterización de films alimentarios basados en mezclas de caseína micelar y proteína de suero de leche*. Universidad Pública de Navarra.
- Ashraf, R., Riaz, S., Hussain, S. S., & Naseem, S. (2015). Effect of pH on Properties of ZnO Nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 2(10, Part B), 5754-5759. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.11.123>
- Bergadà Miró, O. (2007). *Diseño de catalizadores para una obtención limpia de 2-feniletanol* [Universitat Rovira I Virgili]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9086/1INTRODUCCION.pdf;jsessionid=584456A41E9C031DCA86D229A6095920?sequence=2>
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., Ramos Delgado, D., Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., & Ramos Delgado, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 25-33. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Dash, K. K., Deka, P., Bangar, S. P., Chaudhary, V., Trif, M., & Rusu, A. (2022). Applications of Inorganic Nanoparticles in Food Packaging: A Comprehensive Review. *Polymers*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/polym14030521>
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Garde Izquierdo, G. (2014). *Efecto de la adición, tipo y concentración de nanoarcilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas biodegradables basadas en quitosano*. Universidad Pública de Navarra.
- Gennadios, A. (Ed.). (2002). *Protein-Based Films and Coatings*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031980>
- George, J., & Ishida, H. (2018). A review on the very high nanofiller-content nanocomposites: Their preparation methods and properties with high aspect ratio fillers. *Progress in Polymer Science*, 86, 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.006>
- Hoseinnejad, M., Jafari, S. M., & Katouzian, I. (2018). Inorganic and metal nanoparticles and their antimicrobial activity in food packaging applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 161-181. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332001>

- Huber, K., & Embuscado, M. (2009). Edible Films and Coatings for Food Applications. En *Edible Films and Coatings for Food Applications: , ISBN 978-0-387-92823-4. Springer-Verlag New York, 2009.* <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1>
- Joseph, B., Mavelil Sam, R., Balakrishnan, P., J. Maria, H., Gopi, S., Volova, T., C. M. Fernandes, S., & Thomas, S. (2020). Extraction of Nanochitin from Marine Resources and Fabrication of Polymer Nanocomposites: Recent Advances. *Polymers, 12*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/polym12081664>
- Kadam, D., Momin, B., Palamthodi, S., & Lele, S. S. (2019). Physicochemical and functional properties of chitosan-based nano-composite films incorporated with biogenic silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers, 211*, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.005>
- Khan, A., Khan, R. A., Salmieri, S., Le Tien, C., Riedl, B., Bouchard, J., Chauve, G., Tan, V., Kamal, M. R., & Lacroix, M. (2012). Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers, 90*(4), 1601-1608. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.037>
- Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., & Naidu, A. S. (2005). Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by Staphylococcus aureus and Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(2), 797-803. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.797-803.2005>
- Kumari, S., Rath, P., Sri Hari Kumar, A., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation, 3*, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>
- Kurita, K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology, 8*(3), 203-226. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanum dictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry, 112*(1), 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
- 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>
- Lu, Y., Weng, L., & Zhang, L. (2004). Morphology and Properties of Soy Protein Isolate Thermoplastics Reinforced with Chitin Whiskers. *Biomacromolecules, 5*(3), 1046-1051. <https://doi.org/10.1021/bm034516x>
- Lusher, A., Hollman, P. C. H., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety.* Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Marzo Rojas, I. (2010). *Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína.* Universidad Pública de Navarra.
- Mastromatteo, M., Chillo, S., Buonocore, G. G., Massaro, A., Conte, A., Bevilacqua, A., & Nobile, M. A. D. (2009). Influence of spelt bran on the physical properties of WPI composite films. *Journal of Food Engineering, 92*(4), 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.024>

- Mato Martínez, Y. (2017). *IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: PRODUCCION DE ENZIMAS, FERMENTACION Y CONSERVACION DE ALIMENTOS*. <http://www.repositorio.unacar.mx/jspui/handle/1030620191/476>
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(3), 307-312. <https://doi.org/10.1007/BF02638058>
- Nisar, T., Wang, Z.-C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., & Guo, Y. (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 670-680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.068>
- Otín Acín, J. M. (2011). *Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios*. Universidad Pública de Navarra.
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499-7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- Pušková, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D., & Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Ramos, Ó. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 533-552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>
- Rebouillat, S., & Ortega-Requena, S. (2015). Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 06(03), Article 03. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2015.63018>
- Salaberria, A. M., Diaz, R. H., Labidi, J., & Fernandes, S. C. M. (2015). Preparing valuable renewable nanocomposite films based exclusively on oceanic biomass – Chitin nanofillers and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 89, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.003>
- Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V., Lima, M. A. B. de, Franco, L. de O., & Campos-Takaki, G. M. de. (2020). Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms21124290>
- Simbine, E. O., Rodrigues, L. da C., Lapa-Guimarães, J., Kamimura, E. S., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. de. (2019). Application of silver nanoparticles in food packages: A review. *Food Science and Technology*, 39, 793-802. <https://doi.org/10.1590/fst.36318>
- UDLAP, T. (2017, junio 7). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *TSIA*. <https://tsia.udlap.mx/suero-de-leche-y-su-aplicacion-en-la-elaboracion-de-alimentos-funcionales/>

Wu, C., Sun, J., Chen, M., Ge, Y., Ma, J., Hu, Y., Pang, J., & Yan, Z. (2019). Effect of oxidized chitin nanocrystals and curcumin into chitosan films for seafood freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 95, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.047>

Yousuf, B., Sun, Y., & Wu, S. (2022). Lipid and Lipid-containing Composite Edible Coatings and Films. *Food Reviews International*, 38(sup1), 574-597. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1876084>

Zarandona, I., Barba, C., Guerrero, P., de la Caba, K., & Maté, J. (2020). Development of chitosan films containing β -cyclodextrin inclusion complex for controlled release of bioactives. *Food Hydrocolloids*, 104, 105720. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105720>

Ziani, K., Henrist, C., Jérôme, C., Aqil, A., Maté, J. I., & Cloots, R. (2011). Effect of nonionic surfactant and acidity on chitosan nanofibers with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 470-476. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.002>

7. Apéndice

7.1. ANEXO I: ficha técnica del quitosano



Certificate of analysis

Product name	ChitoClear® (Chitosan)	Manufactured by:
Product code	44020 - Ig05LV	Primex ehf
Source	Paratulus borealis	Oskaugata 7
Generic name	β(1→4) D-glucosamine / N-acetyl-D-glucosamine	580 Siglufjörður
Lot number	TM5581	Iceland
Revision number	Rev. 03	Ph: +354 460 6900
Date of manufacture	3.9.2020	Fax: +354 460 6909
Retest date	3.9.2023	IS-A870-EFTA

PARAMETER	TEST METHOD	RESULTS	Comment
Dry Matter Content	CP-001	94 %	
Ash	CP-002	0,9 %	
Turbidity	CP-003	17 NTU	
Viscosity	CP-004 (1% solution)	21 cP (mPa s)	
Solubility	CP-006	99,1 %	
Degree of Deacetylation	CP-010 (chemical method)	95 %	
Sieve Analysis	CP-008	100% through 100 mesh	
Tap density	CP-009	0,62 g/cc	
Appearance	CP-007	White powder	
Taste and odour	CP-007	No taste or smell	
Microbiol:			detected
			limit
Aerobic plate count	NMCL 86	<1100 cfu/g	10 cfu/g
Yeast and mold	NMCL 98	<100 cfu/g	10 cfu/g
Coliform bacteria	ISO 4831	absent	10 cfu/g
E. coli	ISO 7131	absent	0,3 cfu/g
Salmonella sp.	NMCL 71	absent	Neg.
Toxic Heavy Metals:			
Arsenic	SW-846 6020 ICP/MS	none detected	1,0 ppm
Cadmium	SW-846 6020 ICP/MS	none detected	0,20 ppm
Lead	SW-846 6020 ICP/MS	<1,0 ppm	0,10 ppm
Mercury	SW-846 7471 CVAA	none detected	0,01 ppm

MBR – Master Batch Record

CP – Primex Standard Test Methods

NMCL – Nordic Committee on Food Analysis

ISO – International Organization for Standardization

ICP/MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

CVAA – Cold Vapor Atomic Absorption

Reported By: Katerina Bilicova
 Name: Katerina Bilicova
 Title: Laboratory Manager
 Date: 4. 9. 2020.

Approved By: Gudny Hjoga
 Name: Gudny Hjoga Kristjansdottir
 Title: Quality Assurance & Technical Manager
 Date: 25. 9. 2020.

Methods of analysis available upon request

NOTE: Each of colored logs indicates this document is a copy and is not controlled



Primex ehf, Oskaugata 7, 580 Siglufjörður, Iceland, Phone: +354 460 6900, Fax: +354 460 6909

7.2. ANEXO II: ficha técnica del glicerol

	FICHA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	ET-05-00-01
	GLICERINA PH EUR FOOD	Rev. 0

Fórmula Química: C₃H₈O₃

Otros Nombres: Glicerol, 1-2-3 propanotriol.

Características: Es un producto líquido, con aspecto de sirope, claro, incoloro, higroscópico y de olor suave característico. Cumple los requerimientos de la Farmacopea Europea (EP).

Nº aditivo alimentario: E 422

Composición: Glicerina de origen vegetal.

Parámetro	Especificaciones	Unidades
Contenido en propano-1,2,3-triol	≥ 99,7	%
Densidad relativa 20/20°C	1,262	-
Riqueza (base anhidra)	98,0 – 101,0	%
Color Hazen	≤ 10	-
Acidez / alcalinidad	≤ 0,2	mL
Índice de refracción	1,473 – 1,475	-
Aldehídos	≤ 10	ppm
Esteres	≥ 8	ml
Diabloglicol	≤ 0,1	%
Impurezas después del pico de glicerina (CG)	≤ 0,5	%
Impurezas antes del pico de glicerina (CG)	≤ 0,1	%
Compuestos halogenados	≤ 35	ppm
Azúcares	pasa	-
Cloruros	≤ 10	ppm
Metales pesados	≤ 5	ppm
Agua	≤ 0,3	%
Carbosa sulfatas	≤ 0,01	%
Piomo	≤ 2	ppm
Arsénico	≤ 3	ppm
Cadmio	≤ 1	ppm
Mercurio	≤ 1	ppm

Estas informaciones corresponden al estado actual de nuestros conocimientos y se suministra de buena fe. Sin embargo, corresponde al usuario la responsabilidad de cerciorarse que el producto es apropiado para el uso particular al que se le destina y se manipula de acuerdo a la legislación aplicable, tanto local como nacional.

****NOTA**:** Especificaciones mínimas de los productos requeridos por Productos OPPAC, S.A.

PRODUCTOS OPPAC, S.A.
Departamento de Calidad

7.3. ANEXO III: ficha técnica del carvacrol

Identificadores de productos químicos

CAS	499-75-2
Peso molecular (g/mol)	150.22
Nombre IUPAC	2-metil-5-(propan-2-il)fenol

Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Clave InChI	RECUKUPTGUEGMW-UHFFFAOYSA-N
SMILES	CC(C)C1=CC=C(C(C)O)=C1

Especificaciones

Nombre del producto químico o material	Carvacrol
Temperatura de inflamación	106°C
Viscosidad	28.5 mPa.s (20°C)
Punto de fusión	3.0°C
CAS	499-75-2
Fórmula lineal	(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₃ (CH ₂)OH
Información de solubilidad	Solubility ac. soln.: insoluble. Other solubilities: soluble in ethanol and ether
SMILES	CC(C)C1=CC=C(C(C)O)=C1
Peso molecular (g/mol)	150.22

Densidad	0.9760 g/mL
Gravedad específica	0.976
Punto de ebullición	238.0°C
Cantidad	100 g
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Índice Merck	15, 1872
Clave InChI	RECUKUPTGUEGMW-UHFFFAOYSA-N
Nombre IUPAC	2-metil-5-(propan-2-il)fenol
Formula Weight (peso de la fórmula)	150.22

7.4. ANEXO IV: ficha técnica del 2-feniletanol

SECCIÓN 9. Propiedades físicas y químicas

9.1 Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

a) Estado físico	líquido
b) Color	incolore
c) Olor	característico
d) Punto de fusión/ punto de congelación	Punto/intervalo de fusión: -27 °C - lit.
e) Punto inicial de ebullición e intervalo de ebullición	219 - 221 °C a 1.000 hPa - lit.
f) Inflamabilidad (sólido, gas)	Sin datos disponibles
g) Inflamabilidad superior/inferior o límites explosivos	Límite superior de explosividad: 11,9 %(v) Límites inferior de explosividad: 1,4 %(v)
h) Punto de inflamación	102 °C - copa cerrada
i) Temperatura de auto-inflamación	Sin datos disponibles
j) Temperatura de descomposición	Sin datos disponibles
k) pH	6 - 7 a 20 g/l a 20 °C
l) Viscosidad	Viscosidad, cinemática: aprox.14,1 mm ² /s a 20 °C - Directrices de ensayo 114 del OECDaprox.6,27 mm ² /s a 40 °C - Directrices de ensayo 114 del OECD Viscosidad, dinámica: 7,58 mPa.s a 25 °C
m) Solubilidad en agua	17,5 g/l a 25 °C - totalmente soluble
n) Coeficiente de reparto n- octanol/agua	log Pow: 1,3 a 20 °C - No es de esperar una bioacumulación.
o) Presión de vapor	1.000 hPa a 217,7 °C 0,08 hPa a 20 °C
p) Densidad	1,02 g/mL a 20 °C - lit.
Densidad relativa	Sin datos disponibles
q) Densidad relativa del vapor	Sin datos disponibles
r) Características de las partículas	Sin datos disponibles
s) Propiedades explosivas	Sin datos disponibles
t) Propiedades comburentes	ningún

9.2 Otra información de seguridad

Tensión superficial	aprox.59,7 mN/m a 1g/l a 20 °C - Directrices de ensayo 115 del OECD
Densidad relativa del vapor	4,22 - (Aire = 1.0)