



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PLASTIFICANTES Y POLÍMEROS FORMADORES DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE MEDIANTE LA CORRELACIÓN ENTRE SUS PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS Y MECÁNICOS

FRANCISCO JAVIER PALMA GAVILÁN

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería

Profesores Supervisores:

LORETO VALENZUELA

RICARDO PÉREZ

Santiago de Chile, Octubre, 2016.

© 2016, Francisco Javier Palma Gavilán



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE PLASTIFICANTES Y POLÍMEROS FORMADORES DE UNA PELÍCULA COMESTIBLE MEDIANTE LA CORRELACIÓN ENTRE SUS PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS Y MECÁNICOS

FRANCISCO JAVIER PALMA GAVILÁN

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

LORETO VALENZUELA

RICARDO PÉREZ

JOSE MIGUEL AGUILERA

PEDRO BOUCHON

RICARDO SIMPSON

RODOLFO ROMANACH

CRISTIÁN VIAL

Para completar las exigencias del grado de Doctor en Ciencias de la
Ingeniería

Santiago de Chile, Octubre, 2016.

Con mi gorda, mi Isi y mi Popi, somos
un equipo de otro planeta. Se la
dedicamos con mucho cariño a la
Lala.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mi Caro de mi vida. Sin tu ayuda nada de esto ocurriría y como siempre iluminaste este largo camino. Agradezco a Isi y Flo por ser, las amo y tengan presente que todo es posible con esfuerzo y perseverancia. Máma, Kareem, Cami y Reni, muchas gracias por sus años de formación y compañía.

Agradezco a mis tutores Dr. Loreto Valenzuela y Dr. Ricardo Pérez, por permitirme realizar mi doctorado en sus Laboratorios de Biopolímeros y Biomateriales (LBB) y Extracción de Compuestos de Alto Valor (LECAV), respectivamente. Ambos profesores tuvieron un gran impacto en mi formación profesional, por lo cuales estoy muy agradecido. Agradezco a la Dr. Bozena Michniak-Kohn por permitirme realizar mi pasantía doctoral en su Laboratory for Drug Delivery (University of Rutgers) y a su grupo de investigación, en especial a Krizia Karry, por ayudarme con la realización de mi pasantía en dicho laboratorio. Al Dr. Rodolfo Romañach y a Eduardo Hernández agradezco la confianza y ayuda depositada en mi investigación. A la Dra. María Marcela Oyanedel le doy las gracias por la intensa colaboración brindada en la escritura de mi tesis.

Es la ocasión de agradecer a todos mis compañeros de Laboratorio y Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos de la Pontificia Universidad Católica de Chile, quienes colaboraron de distintas formas al desarrollo de mi investigación. Sin embargo, quisiera nombrar a Rodrigo Vergara, Vartan Ishanoglu, Franco de Lucca, Fabián Reyes, Mario Castillo, Andrea Ramos, Rosa Araya y Jakeline Salvatierra.

Finalmente, quisiera agradecer a todas las instituciones que me brindaron ayuda económica para la realización de mis estudios doctorales; al Programa Mecesup, y a DIPEI-PUC. A las becas VRAI-PUC, CONICYT y Fulbright agradezco por el soporte económico brindado para la realización de mi pasantía doctoral en Rutgers, University of New Jersey, USA.

INDICE GENERAL

Pág.

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Películas comestibles	11
1.2 Composición de películas comestibles	13
1.2.1 Polímeros formadores	13
1.2.2 Plastificantes	16
1.3 Evaluación del efecto de plastificante en películas comestibles.....	18
1.3.1 Caracterización morfológica.....	18
1.3.2 Caracterización física.....	20
1.3.3 Caracterización química	24
1.4 Hipótesis.....	30
1.5 Objetivo general.....	30
1.5.1 Objetivos específicos	30
2. MATERIALES Y METODOS	31
2.1 Materiales.....	31
2.2 Métodos.....	31
2.2.1 Soluciones formadoras de películas.....	31
2.2.2 Fabricación de la película	32
2.2.3 Espectroscopía de infrarrojo cercano con imágenes químicas	33
2.2.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier	35
2.2.5 Microscopía electrónica de barrido.....	36
2.2.6 Determinación contenido de agua.....	36

2.2.7	Permeabilidad al vapor de agua	36
2.2.8	Propiedades mecánicas	38
2.2.9	Análisis estadístico	38
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
3.1	Determinación de la abundancia y variabilidad de los componentes de las películas comestibles mediante NIR-CI.	40
3.1.1	Descripción de espectros	39
3.1.2	Distribución de abundancia	42
3.2	Determinación del efecto de plastificantes en las características morfológicas, físicas y químicas de películas comestibles de gelatina y quitosano.	48
3.2.1	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	50
3.2.2	Microestructura	52
3.2.3	Permeabilidad al vapor de agua	58
3.2.4	Propiedades mecánicas	61
3.3	Correlación entre las variables obtenidas por NIR-CI y propiedades mecánicas. .	62
4.	CONCLUSIONES	67
5.	REFERENCIAS	68

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2-1: Componentes usados como plastificantes en este estudio y sus principales características.....	31
Tabla 2-2: Formulación de las películas comestibles usadas en este estudio	32
Tabla 3-1: Coeficientes de correlación entre los espectros NIR promedio de los compuestos puros en toda la región espectral.....	41
Tabla 3-2: Coeficientes de correlación entre los promedios de los espectros NIR pre-tratados con variable normal estándar y un suavizado con segunda derivada Savitzky-Golay para toda la región espectral.....	41
Tabla 3-3: Valores de abundancia total de los componentes de las películas comestibles corregidos y no corregidos por el agua presente en las películas.....	43
Tabla 3-4: Valores de espesor y contenido de agua de la película comestible control y adicionadas con plastificantes.....	55
Tabla 3-5: Valores de la resistencia a la tracción, porcentaje de elongación y módulo elástico (EM) de películas de gelatina y quitosano con plastificantes.....	60
Tabla 3-6: Correlación de la resistencia a la tracción con la desviación estándar de la abundancia de los componentes de las películas.....	64
Tabla 3-7: Correlación de la resistencia a la tracción con la abundancia de los componentes de las películas comestibles.....	65

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Esquema de las funciones selectivas de las películas y recubrimientos comestibles.....	13
Figura 1-2: Esquema general de la estructura de la gelatina.	15
Figura 1-3: Fórmula química estructural de quitosano.	16
Figura 1-4: Representación esquemática de la curva tensión-deformación y los principales descriptores de las propiedades obtenida mediante un ensayo mecánico a las películas poliméricas delgadas.	20
Figura 1-5: Esquema general de la metodología para obtener las imágenes químicas por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR-CI).	25
Figura 2-1: Diagrama esquemático de la medición de la permeabilidad al vapor de agua indicando los valores de presión de vapor de agua.....	33
Figura 3-1a: Espectros NIR de los componentes puros usados para fabricar las películas comestibles.....	37
Figura 3-1b: Espectros NIR de los compuestos puros con el promedio de la segunda derivada después del proceso de normalización.	37
Figura 3-2: Imágenes químicas de la distribución de la abundancia y sus correspondientes histogramas de los polímeros que forman las películas comestibles.	42
Figura 3-3: Valores de abundancia de gelatina y quitosano corregidos por el contenido de agua de las películas y normalizados respecto a los valores de abundancia de gelatina y quitosano de la película control.....	45
Figura 3-4: Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas comestibles de gelatina y quitosano.....	46
Figura 3-5: Aumento de la zona de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas comestibles de gelatina y quitosano control (sin plastificantes), adicionadas con glicerol y adicionadas con sorbitol	50
Figura 3-6: Aumento de la zona de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas de la gelatina, del quitosano y de la película de gelatina, quitosano y triacetina.....	51

Figura 3-7: Imágenes de la superficie y secciones transversales obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de películas comestibles de gelatina y quitosano	53
Figura 3-8: Gráfico de la correlación entre el espesor de las películas con el contenido de agua de las películas adicionadas con plastificantes.....	56
Figura 3-9: Valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas comestibles de gelatina y quitosano sin plastificante, con glicerol, con sorbitol, con PEG400 y con triacetina.	58

RESUMEN

La influencia de un plastificante sobre el comportamiento físico de una película comestible está dada por su interacción con los polímeros formadores. Por otro lado, el análisis de imágenes químicas por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR-CI) permite caracterizar la interacción entre compuestos mediante el análisis de la abundancia de los componentes y su variabilidad. Es por ello que en este trabajo se estudiaron las características estructurales y funcionales de películas comestibles de quitosano y gelatina en función de la adición de plastificantes (glicerol, sorbitol, polietilenglicol (PEG) 400 y triacetina), puros o en mezclas binarias. Además, se correlacionaron los parámetros de abundancia y de variabilidad con la resistencia a la tracción, el porcentaje de elongación y el módulo elástico de las películas. Los cambios observados en los valores de abundancia de los polímeros y en las propiedades mecánicas permitieron concluir que la triacetina presenta la menor interacción con los polímeros, mientras que PEG400 y glicerol mostraron alta interacción con ellos. Mediante el estudio de correlación se observó que la resistencia a la tracción se relaciona con la abundancia de los componentes y su variabilidad. En particular, el modelo $y = 21 + 11,6 \text{ STD}_{(\text{Ge})} - 12,9 \text{ STD}_{(\text{Ch})}$ permitió conocer la alta correlación que existe entre la resistencia a la tracción y la variabilidad de la abundancia de la gelatina y el quitosano ($R^2 = 0,691$ y valor $p = 0,009$). La caracterización mecánica de las películas con técnicas espectroscópicas mediante un análisis rápido y no invasivo se presenta como una nueva herramienta de caracterización en el ámbito del desarrollo industrial de películas comestibles.

Palabras claves: Hidrocoloides, Espectroscopía de infrarrojo cercano, Plastificantes, Interacción molecular, Resistencia a la tracción.

ABSTRACT

The influence of a plasticizer on the physical behavior of an edible film is determined by its interaction with forming polymers. Furthermore, near infrared chemical imaging spectroscopy (NIR-CI) analysis characterizes the interaction between compounds by studying the abundance of components and their variability. This is why, the structural and functional characteristics of chitosan and gelatin based edible films as a function of the addition of plasticizers (glycerol, sorbitol, polyethylene glycol (PEG400) and triacetin), as pure or binary mixtures, were studied in this work. Also, parameters of abundance and variability with tensile strength, percent elongation and elastic modulus of the films were correlated. Changes observed in polymers abundance values and in the mechanical properties allowed to conclude that triacetin have limited interaction with the film forming polymers while PEG400 and glycerol showed high interaction with them. By the correlation study it was observed that the tensile strength is related to the abundance of components and their variability. In particular, the model $y = 21 + 11,6 \text{ STD}_{(\text{Ge})} - 12,9 \text{ STD}_{(\text{Ch})}$ allowed us to know the high correlation between the tensile strength and variability of the abundance of gelatin and chitosan ($R^2 = 0.691$ and $p\text{-value} = 0.009$). The mechanical characterization of gelatin and chitosan based edible films with spectroscopic techniques through a rapid and noninvasive analysis is presented as a new characterization tool in the field of industrial development of edible films.

Keywords: Hydrocolloid, Near-infrared spectroscopy, Plasticizer, Molecular interaction
Tensile strength

1.

INTRODUCCIÓN

1.1 Películas comestibles

En los últimos años ha aumentado el consumo mundial de alimentos más sanos y con altos estándares de calidad, lo cual ha llevado a desarrollar nuevos sistemas de envasado que prolonguen la vida útil de los productos y que, al mismo tiempo, sean reciclables. Esta demanda ha traído consigo una búsqueda de nuevas tecnologías cuyo objetivo es que el consumidor obtenga un producto que conserve sus propiedades organolépticas de origen, pese al tiempo transcurrido desde su obtención hasta su consumo. El presente estudio se centra en caracterizar una opción plausible para extender la vida útil de los alimentos que reúna los factores requeridos por la población mundial.

Existen varios procesos químicos y físicos, tales como esterilización, alta presión, radiaciones o adición de agentes activos para preservar las propiedades y la calidad de los alimentos. Sin embargo, el uso de envases se hace necesario en el último paso del proceso de preservación y en ese campo aún faltan estudios que permitan desarrollar alternativas amigables con el medio ambiente, de menor costo y con mejor funcionamiento (Debeaufort, Quezada-Gallo, y Voilley, 1998).

Una opción de envasado de alimentos son las películas comestibles, las cuales podrían reducir el uso de envases sintéticos, pese a que estos últimos presentan gran eficiencia para reducir la transferencia de masa entre el alimento y el medio que lo rodea. Las películas comestibles están formadas por una o varias capas delgadas de un material polimérico que pueden ser consumidas por los humanos y que, a su vez, pueden actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos de alimentos (Guilbert, 1986). Mediante la aplicación de una película comestible es posible proteger al alimento contra el deterioro físico, químico y biológico (Kester O. R., 1986). En particular, las películas comestibles pueden mejorar tanto la resistencia física de los productos alimenticios como la

apariencia visual y táctil de la superficie del alimento (Cuq, Gontard, y Guilbert, 1998).

Las películas comestibles deben poseer características que permitan extender la vida útil de los alimentos, además de propiedades que les permitan ser consumidas (Figura 1-1). Las características necesarias para extender la vida útil dependen de los factores intrínsecos del producto alimenticio a proteger. Por ejemplo, para los alimentos sensibles a la oxidación (i.e., alimentos ricos en grasas poliinsaturadas), las películas deben poseer baja permeabilidad al oxígeno, mientras que las frutas y las verduras requieren una selectividad en la transferencia de masa de los gases asociados a la respiración (i.e., O_2 , CO_2 y etileno) (Dhall, 2013). A continuación, se resumen los requerimientos fundamentales que deben poseer las películas comestibles (Gorris y Arvanitoyannis, 1999) y que fueron considerados al momento de determinar los biopolímeros con los cuales trabajar en la presente investigación:

- Utilizar materias primas de bajo costo y fácil procesamiento.
- Ser no contaminantes.
- Ser libres de compuestos tóxicos.
- Tener una calidad sensorial acorde al alimento.
- Tener estabilidad bioquímica y físico-química.
- Presentar alta eficiencia, tanto mecánica como de barrera.

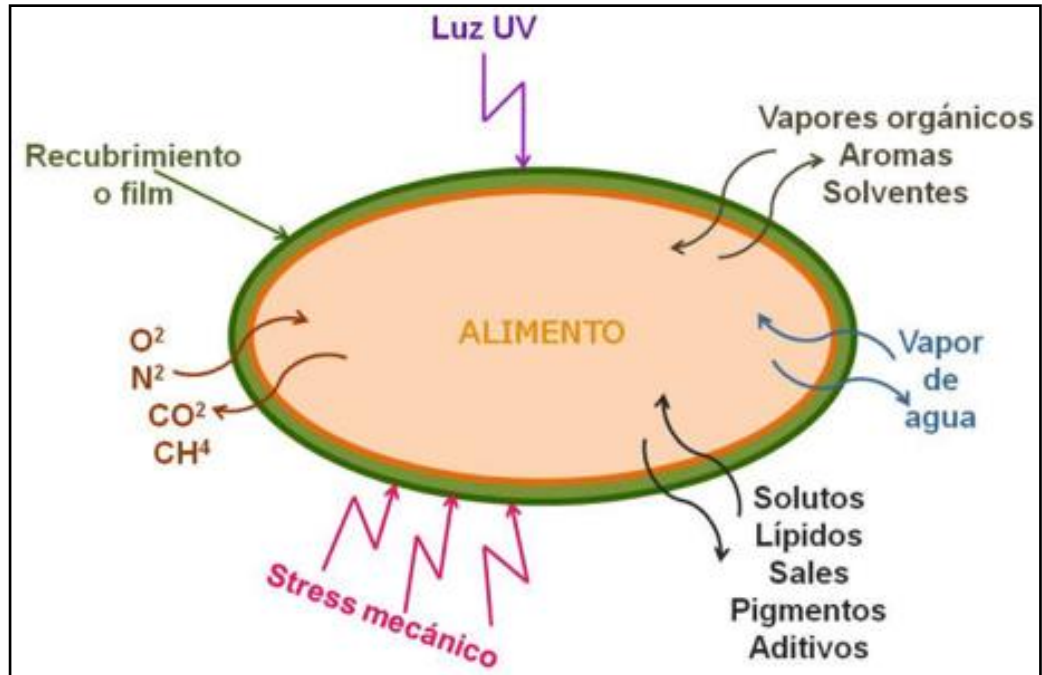


Figura 1-1: Esquema de las funciones selectivas de las películas y recubrimientos comestibles (Adaptado por Parzanese, T.M., 2006, de Debeaufort y Voilley, 1998).

1.2 Composición de películas comestibles

1.2.1 Polímeros formadores

Proteínas, polisacáridos, lípidos y resinas son los polímeros que habitualmente se utilizan para fabricar películas comestibles. Dependiendo del propósito de la película y de la naturaleza química del alimento, los polímeros formadores pueden ser empleados solos o en combinación. Por ejemplo, empleando como polímeros formadores una mezcla de proteínas y polisacáridos es posible formar películas uniformes, con alta permeabilidad a los gases y adecuadas propiedades mecánicas. Estas características se obtienen debido a que los polímeros presentan gran cantidad de grupos hidroxilo por molécula (compuestos con alta polaridad) permitiéndoles formar complejos polielectrolitos. Son estas características las que permiten clasificar a proteínas y polisacáridos como materiales hidrocoloides (Skurtys et al., 2010). Los polímeros hidrocoloides son total o parcialmente solubles en agua y pueden ser obtenidos de diversas fuentes: vegetal, animal, microbiana o de origen sintético. Los

hidrocoloides aumentan la viscosidad de la fase continua (fase acuosa); es decir, cumplen una función de agente gelificante o espesante (Debeaufort et al., 1998). No obstante, también pueden ser utilizados como agentes emulsionantes, ya que estabilizan emulsiones al incrementar la viscosidad de la fase acuosa de la solución formadora (Skurtys et al., 2010).

Las proteínas son hidrocoloides rutinariamente utilizados en la fabricación de películas comestibles. Esto se debe a que son un recurso renovable, amigable con el medio ambiente, ubicuo, de bajo costo y que, de igual manera, permite formar películas poliméricas cohesivas a bajas temperaturas. La capacidad de las gelatinas para formar películas cohesivas se obtiene por la interacción entre sus cadenas poliméricas, que son estabilizadas por interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces covalentes y puentes disulfuro (Dangaran, Tomasula, y Qi, 2009; Krochta, Baldwin, y Nisperos-Carriedo, 1994). Estas interacciones se dan por propiedades inherentes de las proteínas, tales como distribución de cargas y cantidad de aminoácidos polares y no polares a lo largo de la proteína. Finalmente, estas características inherentes de las proteínas determinan las propiedades físico-químicas de la película que forman.

La gelatina es un tipo de proteína que se utiliza comúnmente en la fabricación de películas comestibles. Destaca por su capacidad de gelificar a bajas temperaturas, presenta una alta solubilidad en agua, es altamente ubicua y de bajo costo. La gelatina es una proteína compleja de origen animal compuesta principalmente de proteínas (84-90% p/p), sales minerales (1-2% p/p) y agua (Figura 1-2). Se obtiene mediante la denaturación térmica del colágeno. Posee una estructura de triple-hélice estabilizada principalmente por la formación de puentes de hidrógeno inter-cadena entre los grupos carbonilos y aminas (Rivero, García, y Pinotti, 2010). Recientemente, las gelatinas de origen marino han atraído el interés para la fabricación de películas comestibles, debido al riesgo percibido con las gelatinas extraídas de vaca por su relación con la encefalopatía espongiforme bovina (enfermedad de las vacas locas). Más aún, las gelatinas de pescado de ambientes fríos presentan temperaturas de fusión y gelificación menores que aquellas de las gelatinas de mamíferos, debido a su composición de

aminoácidos (Chiou et al., 2009; Rahman, Ai-Saidi, y Guizani, 2008). Es por esto que la fabricación de películas comestibles de gelatina de origen marino se vislumbra como una opción plausible para ser empleada en matrices que no pueden ser expuestas a altas temperaturas (por ejemplo, matrices cárnicas frescas).

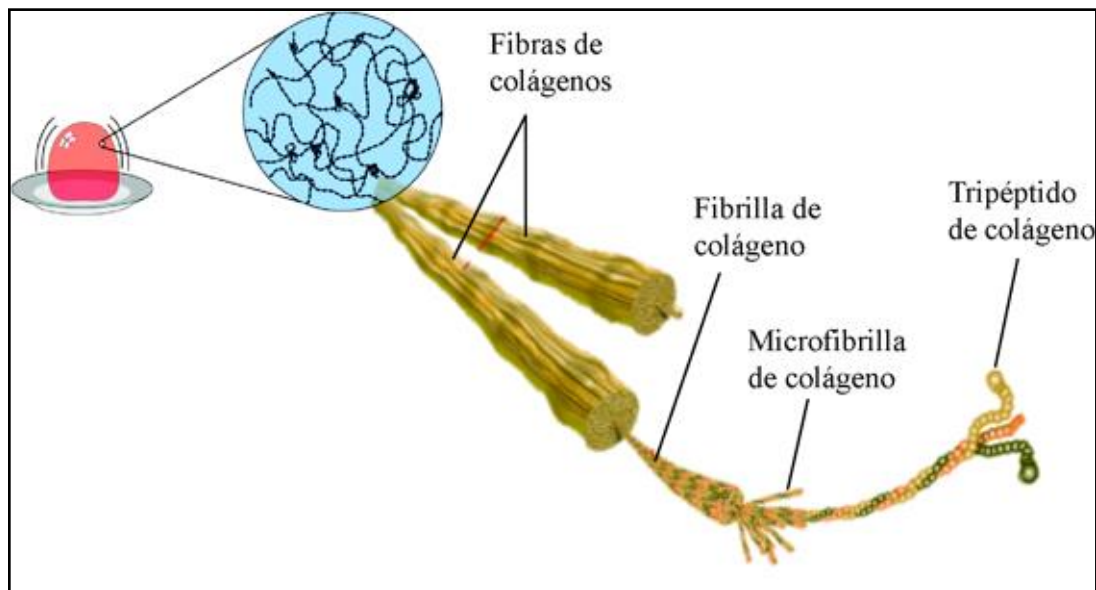


Figura 1-2: Esquema general de la estructura de la gelatina (Adaptado propio, imágenes obtenidas desde www.thenakedscientists.com y www.sigmaaldrich.com).

Los polisacáridos, otro tipo de hidrocoloides, tienen la capacidad de espesar y/o gelificar en soluciones acuosas, lo que permite generar películas con características plásticas, de adecuados valores de resistencia a la tracción, transparentes y con alta solubilidad (Nieto, 2009). Adicionalmente, las películas de polisacáridos presentan valores de permeabilidad al oxígeno bajos que, incluso, en condiciones secas, pueden llegar ser 3000 veces menos que la de los polímeros plásticos (Debeaufort y Voilley, 2009). Esto permite la mejora de la vida útil del alimento sin crear condiciones anaeróbicas (Baldwin E.A., Nispero-Carriedo M.O., y Baker, 1995).

El quitosano (Figura 1-3) es un polisacárido catiónico derivado de la quitina que, además de presentar una alta capacidad de barrera contra el oxígeno, presenta capacidad antimicrobiana, alta biodegradabilidad, biocompatibilidad y no-toxicidad (Elsabee y Abdou, 2013; van den Broek, Knoop, Kappen, y Boeriu, 2015).

Químicamente, es un polisacárido lineal compuesto por unidades de D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) unidas por enlace β -(1-4).

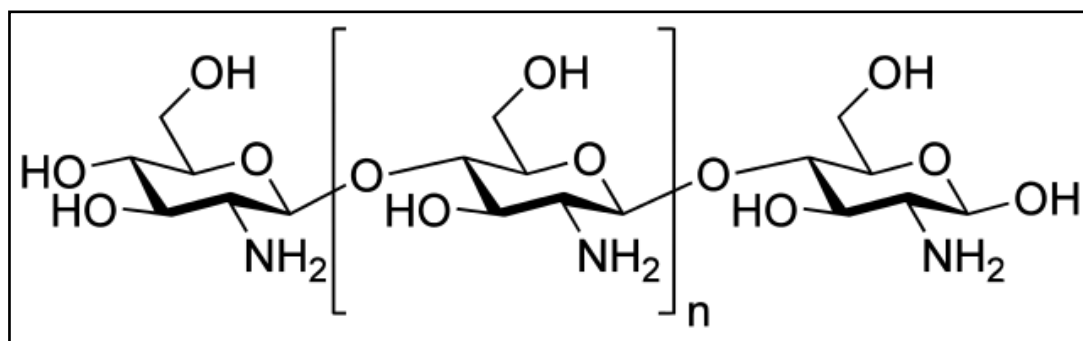


Figura 1-3: Fórmula química estructural del quitosano (PubChem CID: 71853).

Las propiedades funcionales de las películas comestibles pueden ser mejoradas mediante la combinación de polímeros hidrocoloides. Por ejemplo, se ha observado en algunos casos que la permeabilidad de películas comestibles disminuye mediante la combinación de polímeros, respecto a la permeabilidad de los compuestos puros (Xu, Kim, Hanna, y Nag, 2005). Este es el caso de las películas de gelatina y quitosano, las cuales presentan menor permeabilidad al vapor de agua que las películas de quitosano o gelatina por sí solas (Gómez-Estaca, Montero, Giménez, y Gómez-Guillén, 2007; Rivero, García, y Pinotti, 2009). Esto se debe a la formación de interacciones electrostáticas entre los grupos amonios del quitosano y los grupos carboxilos de la gelatina (Elsabee y Abdou, 2013).

1.2.2 Plastificantes

Las películas comestibles son producidas como resultado de diversas interacciones moleculares, incluyendo enlaces covalentes (e.g., enlaces simples, dobles y triples, y puentes disulfuros), entrecruzamiento e interacción iónica, hidrofóbica y electrostática entre los polímeros que las conforman. Estas interacciones entre polímeros hidrocoloides son las responsables de generar películas comestibles rígidas y quebradizas con menor protección al alimento (Cao, Yang, y Fu, 2009; Rivero et al.,

2010). Sin embargo, es posible mejorar las propiedades mecánicas de este tipo de películas mediante la adición de compuestos de bajo peso molecular no volátiles, conocidos como plastificantes. En general, los plastificantes producen un aumento del volumen libre de la estructura polimérica y de la movilidad molecular de los polímeros, disminuyendo la razón entre la región cristalina y la región amorfa, y disminuyendo la temperatura de transición vítrea (Sothornvit y Krochta, 2005). Estos cambios llevan a disminuir la fragilidad de las películas, a incrementar la flexibilidad, la dureza y la resistencia al impacto, y a prevenir la aparición de grietas durante el embalaje y el transporte (Cao et al., 2009).

Los plastificantes más comúnmente utilizados en películas comestibles son monosacáridos, oligosacáridos, polioles, lípidos y derivados de estos. Otra molécula con capacidad plastificante es el agua, por lo cual es necesario considerar su contenido al momento de la fabricación de una película. Al seleccionar entre los distintos tipos de estos plastificantes, es necesario considerar tres aspectos fundamentales: i) la compatibilidad con el polímero; ii) la eficiencia, generalmente un plastificante eficiente entrega una alta plastificación en baja concentración y exhibe rápida difusión e interacción con los polímeros formadores de la película, y iii) la permanencia del plastificante en los polímeros.

En general, la mayoría de los plastificantes contienen grupos hidroxilos, los cuales forman puentes de hidrógeno con los biopolímeros y además aumentan el volumen libre y la flexibilidad de la película. El mecanismo mediante el cual se generan estos cambios puede ser interno y/o externo (Immergut y Mark, 1965). El proceso de plastificación interno modifica químicamente la cadena polimérica a través de la adición de un grupo sustituyente unido mediante enlace covalente, copolimerizando con el polímero y generando una desorganización de su estructura. Esto genera que las cadenas poliméricas queden más separadas, estructurando una matriz menos rígida. Por otra parte, el proceso de plastificación externo se produce cuando un compuesto plastificante se intercala en la red polimérica, interactuando físicamente con ella. En este mecanismo externo de plastificación se genera una disminución en la temperatura de transición vítrea y aumenta el volumen libre entre las cadenas (Immergut y Mark,

1965). Sin embargo, los plastificantes externos pueden migrar en el polímero, lo que puede conducir a la recristalización del material y a la pérdida de elasticidad (Real et al., 2013). Experimentalmente se ha observado que, dependiendo del mecanismo de plastificación que se genera, se producen diferencias en las propiedades mecánicas y el comportamiento térmico de las películas poliméricas (Fringant, Rinaudo, Foray, y Bardet, 1998; Videki, Klebert, y Pukanszky, 2007).

Los plastificantes, además de mejorar las propiedades mecánicas de las películas, pueden aumentar la permeabilidad a ciertos gases, disminuyendo así su efectividad para la protección de alimentos (McHugh, Aujard, y Krochta, 1994). Esto depende de aspectos intrínsecos de los plastificantes, tales como estructura química, peso molecular y polaridad (Mitchell, 1986; Sothornvit y Krochta, 2005). Es por esto que la elección del plastificante considerando sus características intrínsecas es un aspecto importante en la formulación de una película comestible.

1.3 Evaluación del efecto del plastificante en películas comestibles

El impacto de la adición de plastificantes se refleja en el comportamiento físico de una película comestible. Es posible realizar una completa evaluación del efecto de los plastificantes en las películas comestibles mediante la caracterización de su morfología y de sus propiedades físicas, y la identificación de los cambios en las interacciones químicas entre los polímeros y los plastificantes (Sothornvit y Krochta, 2005).

1.3.1 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las películas entrega una descripción fácilmente obtenible del impacto de la adición de un plastificante. Entre las caracterizaciones más utilizadas en el campo de las películas comestibles se encuentran el estudio del espesor y de la microestructura.

a) Espesor

El espesor de las películas comestibles es un parámetro importante, ya que afecta directamente las propiedades biológicas y la vida útil de los alimentos (Skurtys et al., 2010). Esto se debe al efecto que tiene en las propiedades funcionales tales como propiedades mecánicas, de barrera y de absorción de la luz. Por ejemplo, películas

hidrófilas presentan relaciones de pendiente positiva entre el espesor y la permeabilidad al vapor de agua (Mchugh, Avenabustillos, y Krochta, 1993).

El espesor de las películas depende del método utilizado para su fabricación (inmersión, aspersión, moldeado del solvente, etc.), junto con la concentración y la composición de los polímeros formadores utilizados (Rangel-Marrón, Montalvo-Paquini, Palou, y López-Malo, 2013; Skurtys et al., 2010). Un ejemplo de componentes que determinan el espesor de las películas es la adición de plastificantes (Bozdemir y Tutas, 2003; Galdeano, Wilhelm, Mali, y Grossmann, 2013; Wittaya, 2013). Esto se debe a que las moléculas plastificantes se unen a lo largo de las cadenas poliméricas reemplazando las uniones polímero-polímero y obstaculizan la formación de fuerzas que mantienen los polímeros unidos (fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, etc.) (Sothornvit y Krochta, 2005). Esto implica un aumento en el volumen libre de la red polimérica de las películas comestibles. En el caso particular de las películas comestibles en base a gelatina y quitosano, se ha observado que su espesor depende de la concentración de quitosano (Jridi et al., 2014).

b) Microestructura

La caracterización de la microestructura de las películas comestibles permite conocer aspectos fundamentales de la película (espesor, heterogeneidad, estructura de las capas, presencia de poros y uniformidad) y sus potenciales aplicaciones (M. García, Pinotti, Martino, y Zaritzky, 2009). Los cambios morfológicos habitualmente reportados consideran la microestructura de las capas, la presencia de poros y grietas y la uniformidad de la superficie. Estas características son gobernadas por el tipo y el grado de interacción entre los componentes de la película comestible (Skurtys et al., 2010). Es por esto que las interacciones entre los componentes (que pueden ser estudiadas mediante el análisis de la microestructura) se pueden relacionar con las propiedades funcionales de las películas. Por ejemplo, Jiménez et al. (2010) estudiaron la microestructura de una película de hidroxipropil metilcelulosa con ácidos grasos durante el proceso de secado, permitiendo determinar que la evaporación de solvente provoca cambios en la concentración de componentes y viscosidad de la fase líquida,

lo que afecta finalmente a las propiedades ópticas, de barrera y mecánicas de las películas.

La adición de compuestos que modifican las interacciones de los polímeros formadores, tales como los plastificantes, genera cambios en la microestructura de las películas y determina sus propiedades (Ghanbarzadeh et al., 2007). Estos cambios pueden ser modificaciones de las zonas cristalinas y amorfas, lo cual es posible estudiar mediante el análisis de su microestructura. Ejemplo de esto es lo realizado por Kurusu et al. (2015), quienes observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por su sigla en inglés) las capas amorfas en películas de poli 3-hidroxibutirato y cómo éstas varían con la adición de ciertos plastificantes, permitiendo determinar la mezcla óptima entre plastificantes y polímeros formadores de la película. A su vez, Pan et al. (2014) encontraron que la modificación de la microestructura es el factor que determina las diferencias en las propiedades mecánicas y de barrera en películas de proteína de soya/ácido láurico. Por otra parte, Guilbert et al. (1996) demostraron que las microestructuras cohesivas formadas entre los polímeros determinan la formación de películas continuas y uniformes, e influyen en la resistencia mecánica. Jridi et al. (2014), por su parte, modificaron la microestructura de películas de gelatina mediante entrecruzamientos de enlaces covalentes y no-covalentes con la adición de quitosano. Este entrecruzamiento provoca la formación de una microestructura homogénea y constante, con una superficie lisa y sin rupturas, visualizada mediante microscopía electrónica de barrido.

1.3.2 Caracterización física

Las propiedades funcionales de las películas, tales como las propiedades mecánicas y las propiedades de barrera, son influenciadas por la adición de plastificantes (Bergo y Sobral, 2007).

a) Propiedades mecánicas.

Los parámetros mecánicos que describen el desempeño de las películas son: i) resistencia a la tracción (RT), parámetro que entrega información cuantitativa de la resistencia que ofrece un material cuando está sometido a un esfuerzo de tracción; ii)

porcentaje de elongación (%E), medida que permite evaluar la ductilidad; y iii) módulo elástico (ME), que indica la rigidez o resistencia a la deformación del material y se obtiene a partir de la pendiente de la primera zona de la curva obtenida en el gráfico tensión-deformación (Figura 1-4). Este gráfico se obtiene mediante la utilización de la norma de la Sociedad Americana para el Testeo de Materiales (ASTM) según el método ASTM D882-12 (ASTM, 2012). Este ensayo consiste en someter a una muestra normalizada (película comestible con dimensiones estándar) a un esfuerzo axial de tracción creciente hasta que se produce la rotura de la misma. El ensayo permite determinar la deformación (alargamiento) de la muestra entre dos puntos fijos de la misma a medida que se incrementa la carga aplicada y se representa gráficamente en función de la tensión (carga aplicada dividida por la sección de la muestra), tal como lo muestra la figura 1-4.

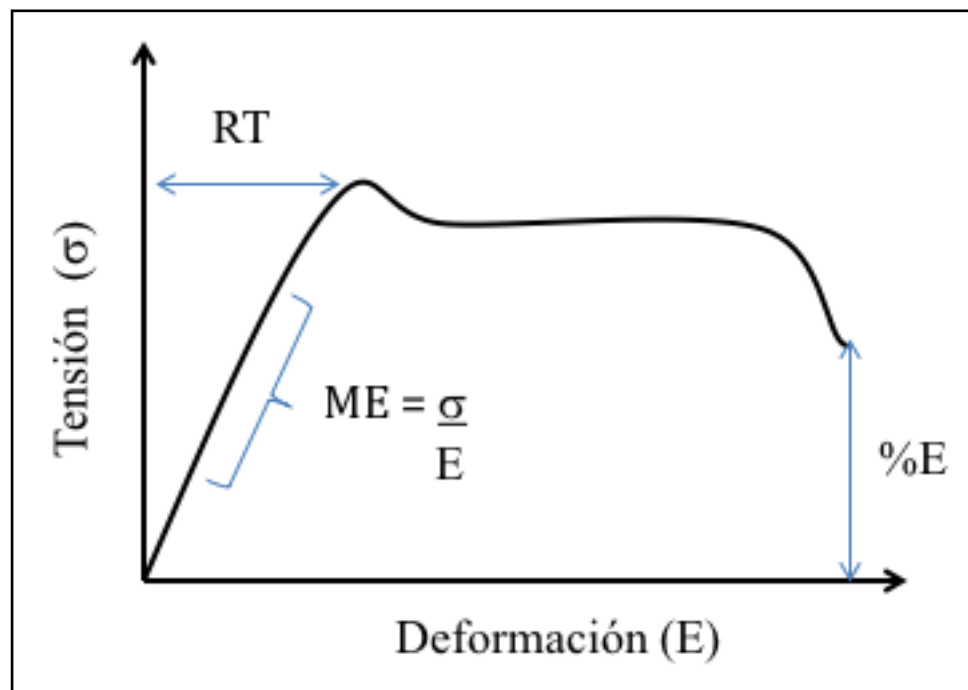


Figura 1-4: Representación esquemática de la curva tensión-deformación y los principales descriptores de las propiedades obtenidas mediante un ensayo mecánico a las películas poliméricas delgadas, donde RT, ME y %E corresponden a resistencia a la tracción, módulo elástico y porcentaje de elongación, respectivamente.

La comparación del comportamiento mecánico de películas es complejo debido a la variabilidad en la manipulación o procedimientos de evaluación. Sin embargo es posible parametrizar los valores de la resistencia a la tracción de películas comestibles, los cuales pueden variar entre 10 y 100 MPa, mientras que los valores de módulo elástico se encuentran en el rango de 1 a 80% (Skurtys et al., 2010). Es posible modificar las propiedades mecánicas de las películas mediante la incorporación de plastificantes. Los plastificantes mejoran las propiedades mecánicas y otorgan estabilidad a las películas comestibles (Kołodziejaska y Piotrowska, 2007) mediante la relajación de las interacciones moleculares entre los polímeros formadores (Sothornvit y Krochta, 2005). Asimismo, interrumpen las estructuras cristalinas presentes en la película y/o separan las cadenas poliméricas entrecruzadas, afectando la red polimérica que forma la película. Este efecto en la red polimérica implica que la resistencia a la tracción disminuya con el aumento de la cantidad de plastificante. De igual modo, el incremento de la cantidad de plastificante provoca la disminución del módulo elástico, mientras que el aumento de la elongación (Senichev y Tereshatov, 2012).

El comportamiento mecánico de las películas comestibles de quitosano y gelatina varía en función de la razón entre gelatina y quitosano (Fakhreddin Hosseini, Rezaei, Zandi, y Ghavi, 2013). La adición de quitosano produce un aumento significativo en la resistencia a la tracción y el módulo elástico, dando lugar a películas más “fuertes” en comparación con una película de gelatina, pero con una elongación significativamente menor. Siguiendo esta misma línea, Jridi et al. (2014) observaron un aumento de valores de resistencia a la tracción y una disminución de valores de elongación al quiebre, con un incremento del contenido de quitosano. Este cambio mecánico podría ser atribuido al entrecruzamiento de la red polimérica entre la gelatina y el quitosano debido a la gran afinidad entre ambos hidrocoloides (Gómez-Estaca, Gómez-Guillén, Fernández-Martín, y Montero, 2011). Adicionalmente, Benbettaïeb et al. (2014) postularon que el incremento de la resistencia a la tracción está relacionado con la formación de una matriz más estable debido a las interacciones entre quitosano y gelatina. Sin embargo, a nuestro conocimiento, el efecto de la adición de distintos

plastificantes en las propiedades mecánicas de películas de gelatina y quitosano aún no ha sido reportado.

b) Propiedades de barrera.

Conocer el valor de permeabilidad al vapor de agua (WVP por su sigla en inglés) de una película comestible puede ser útil para comprender los posibles mecanismos de transferencia de masa y de soluto, las interacciones de los polímeros que componen las películas comestibles y la efectividad para extender la vida útil de un producto (Bertuzzi, Castro Vidaurre, Armada, y Gottifredi, 2007). En general, el transporte de moléculas de gas a través de una película comestible obedece a la Ley de Fick y el proceso consiste en tres etapas: i) adsorción de la molécula permeante hacia la superficie de la película; ii) difusión de la molécula permeante desde un lado de la película hacia el otro, y iii) desorción de la molécula desde la película comestible.

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua es fuertemente dependiente de las condiciones de medición, tales como temperatura y gradiente de la presión de vapor de agua. No obstante lo anterior, es posible mencionar que, en general, los valores de WVP de películas fabricadas a partir de materiales biodegradables se encuentran entre un rango de 1 y $10 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, mientras que los valores de las películas fabricadas con materiales sintéticos rondan los $5 \times 10^{-13} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ (M. García et al., 2009). La metodología estándar utilizada para determinar la WVP de películas comestibles se basa en la norma ASTM (ASTM, 2010) (método del vaso, explicado en la sección 2.2.7). En términos generales, permite obtener los valores de permeabilidad sellando un vaso con una película comestible con dimensión conocida. Luego se somete a una cámara con un diferencial de presiones parciales de vapor de agua, bajo condiciones controladas de temperatura. Gennadios et al. (1994) modificaron el protocolo mediante la incorporación del efecto del aire remanente sobre y bajo la película comestible. Esto permite corregir los valores de WVP entre un 5% y un 46%.

Como consecuencia de la adición de plastificantes se aumenta la permeabilidad al vapor de agua de las películas (Sothornvit y Krochta, 2005). Esto se debe a que los plastificantes interactúan con los polímeros que forman las películas comestibles. Estas interacciones se originan por uniones de puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas,

permitiendo así disminuir las regiones cristalinas del polímero (Immergut y Mark 1965). Generalmente, estas regiones son inaccesibles para la mayoría de los compuestos, mientras que las regiones no-cristalinas (amorfos) son aquellas donde ocurren los procesos de sorción y difusión de los compuestos penetrantes tales como O_2 , CO_2 y H_2O (Rogers, 1985). Con el aumento de grupos OH de los plastificantes, disminuyen las atracciones intermoleculares entre cadenas de polímeros adyacentes y aumenta el número de moléculas de agua en la matriz polimérica. Esto lleva finalmente a aumentar la solubilidad de las películas y, por consiguiente, su permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles de gelatina y quitosano demuestra ser dependiente del espesor de la película (Pereda, Ponce, Marcovich, Ruseckaite, y Martucci, 2011), de la concentración de polímero (Hosseini, Rezaei, Zandi, y Ghavi, 2013) y de la concentración de plastificante (Arvanitoyannis, Nakayama, y Aiba, 1998; Gómez-Estaca et al., 2011). En particular, el incremento en el contenido total de plastificante en este tipo de películas aumenta la permeabilidad al vapor de agua (Sothornvit y Krochta, 2005). Aún no existen registros de estudios que evalúen el efecto del tipo de plastificante en la permeabilidad de películas de gelatina y quitosano.

1.3.3 Caracterización química

Las interacciones entre los polímeros formadores de una película determinan sus propiedades físicas, morfológicas y funcionales (Rivero et al., 2009). Como consecuencia, el estudio y el análisis de estas interacciones entregan una completa descripción de las propiedades de una película comestible. A continuación se especifican dos tipos de espectroscopía de infrarrojo (IR, por su sigla en inglés) que permiten el estudio de estas interacciones entre los polímeros formadores de una determinada película.

- a) Espectroscopía de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FTIR).

Una forma de estudiar las interacciones moleculares entre los componentes de una muestra es utilizando espectroscopía IR (Lefèvre y Subirade, 2001). La espectroscopía

de infrarrojo permite obtener información de la estructura química interna de una muestra (por ejemplo, el carácter o la cantidad de un enlace particular presente en la muestra) mediante la evaluación de las frecuencias a las cuales las moléculas rotan y vibran (Zapf, 2009). Cuando estos enlaces químicos moleculares vibran, pueden alcanzar la frecuencia (por ejemplo la frecuencia de infrarrojo) de vibración del enlace. Como resultado, se produce el proceso de absorción, el cual es posible cuantificar mediante técnicas espectroscópicas. La espectroscopía de infrarrojo medio (MidIR) ha sido utilizada para la evaluación de la composición, la estabilidad y el espesor de películas comestibles (Zapf, 2009). En particular, dado que los grupos funcionales de los componentes de una película absorben a una determinada frecuencia, es posible elucidar la estructura química del material con su espectro IR.

Para mejorar la resolución de los espectros MidIR y obtener mayor sensibilidad, surge la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). La mejora de sensibilidad se obtiene como consecuencia de una mayor energía de flujo del haz de luz hasta llegar al detector y de una mejora de la relación señal/ruido por mediación de interferogramas (Coates, 2010). Esto ha permitido emplear la espectroscopía FTIR para estudiar la interacción química entre biopolímeros (Lefèvre y Subirade, 2001). En películas comestibles de gelatina y quitosano, Hosseini et al. (2013) evidenciaron que la adición de quitosano a la mezcla polimérica provoca una disminución de los picos a 1662 cm^{-1} y $1644 - 1654\text{ cm}^{-1}$ del espectro de FTIR. Esto lo atribuyeron a un cambio conformacional de las cadenas polipeptídicas de gelatina, lo que genera una disminución de presencia de α -hélices, espirales al azar y estructuras desordenadas. La formación de complejos de polielectrolitos solubles producto de las interacciones electrostáticas de ambos compuestos también se evidencia a través de FTIR. Esto se atribuye al aumento de la absorbancia de los grupos amidas-II y amidas-III cuando se aumenta la concentración de quitosano. Se observa que las modificaciones de las interacciones intermoleculares pueden ser estudiadas mediante espectroscopía IR. Dado que las interacciones pueden ser modificadas mediante la adición de plastificantes, la espectroscopía IR permite estudiar el efecto de la adición de plastificantes a una película comestible.

b) Imágenes químicas de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR-CI).

La espectroscopía de infrarrojo cercana (NIR, por su sigla en inglés) es un tipo de IR utilizada, principalmente, para estudiar los sobretonos y las combinaciones de bandas de C-H, O-H, N-H y, además, los estiramientos y los modos de vibración de enlaces, que, en su conjunto, proporcionan información molecular altamente específica para la identificación de especies (Furukawa, Sato, Shinzawa, Noda, y Ochiai, 2007). Algunos avances tecnológicos recientes en esta área permiten la identificación cuantitativa y espacial de las especies químicas en una muestra, mediante la fusión de la espectroscopía de infrarrojo cercano con la microscopía, a lo cual se le denomina espectroscopía de imágenes químicas mediante infrarrojo cercano (NIR-CI, por su sigla en inglés).

La espectroscopía NIR-CI utiliza la teoría de la espectroscopía de infrarrojo cercano convencional, junto a un sistema que permite obtener múltiples imágenes a través de numerosas longitudes de onda. La imagen resultante es una matriz tridimensional (3D) o cubo hiperespectral de datos (Figura 1-5), de dos dimensiones espaciales y una dimensión espectral (Gendrin, Roggo, y Collet, 2008). La técnica NIR convencional proporciona el espectro promedio de cada muestra; sin embargo, la espectroscopía de NIR-CI entrega un espectro de cada píxel de la superficie completa de la muestra, permitiendo una caracterización química completa, rápida y no destructiva. La metodología para la obtención de una imagen química por espectroscopía está formada por la adquisición de miles de imágenes a través de numerosos longitudes de ondas. La imagen resultante forma una matriz tridimensional con dos dimensiones espaciales con una serie de longitudes de onda haciendo el tercer eje (espectral). Finalmente, se extrae información espacial y cuantitativa de alta calidad mediante herramientas de procesamiento de imágenes y quemométricas. Sin embargo, extraer esta información relevante desde la gran cantidad de datos que se generan es un factor crítico del análisis. El protocolo estándar utilizado para realizar este proceso consta de: i) un preprocesamiento para corregir los efectos de dispersión (corrección línea base y normalización), ii) la extracción de los mapas de distribución, y iii) la extracción de los parámetros cuantitativos (abundancia y su distribución).

i) Preprocesamiento

La etapa de preprocesamiento se utiliza para remover artefactos espectrales y espaciales del cubo hiperespectral, tales como superficies rugosas, efectos ópticos y detección de ruido. La primera etapa es la correlación de la línea base para reducir el efecto de fondo de la variación espectral no controlada. La segunda etapa (normalización) se emplea para corregir la variación de la intensidad que presentan los espectros puros. Las curvas respectivas se suavizan utilizando la segunda derivada y el algoritmo de Savitzky-Golay, ya que permite mantener la precisión de la información. El objetivo de este procesamiento de datos es sustituir los datos originales sin producir distorsión, preservando el ancho y alto de los picos de las señales originales. Este filtro produce una señal más suave que la señal original, pero con el mismo número de puntos. El grado de suavización está controlado por el número específico de datos usados en el ajuste y por el orden del polinomio.

ii) Extracción de los mapas de distribución

Los componentes químicos en la muestra son localizados mediante la obtención de los mapas de distribución. Esto se realiza mediante herramientas quemométricas (métodos de análisis univariados y multivariados). La elección del método más apropiado depende de la información disponible, las formas espectrales de los componentes puros en el sistema estudiado y el ruido experimental.

iii) Extracción de los parámetros cuantitativos

La abundancia de cada componente y su distribución en la superficie de la muestra son los datos más relevantes obtenidos a partir de este análisis (Lewis y Kidder, 2010; Puchert, Lochmann, Menezes, y Reich, 2010). Al respecto, la abundancia es un término utilizado en el campo de estudio de las imágenes químicas y corresponde a la intensidad de cada pixel que refleja la cantidad de un componente analizado se predice estará presente en esa localidad espacial. Por lo tanto, mientras más brillante el pixel, mayor es el contenido del compuesto predicho en esa localidad (Lewis y Kidder 2010). Es importante mencionar que el término abundancia no suscita consenso en el campo de las ciencias de la ingeniería, ya que se puede entender como sinónimo de

concentración (cantidad/volumen). Sin embargo, en el estudio de las imágenes químicas no se conoce con exactitud el volumen, solo la superficie o área (aun considerando que hay cierta penetración de la radiación). Por lo tanto, el término abundancia surge de la necesidad de describir la distribución de un componente en una superficie, donde una dimensión es un volumen incierto.

El valor reportado de abundancia en una película comestible es un promedio de los distintos valores de abundancia predicha en cada pixel de esa película. Conociendo cuán dispersos se encuentran los valores de abundancia en una determinada película, es posible cuantificar la uniformidad de la distribución del compuesto en la película mediante la determinación de la variabilidad de la abundancia. Por lo tanto, a mayor variabilidad, mayor grado de heterogeneidad de la distribución del compuesto en la película.

Así como la variabilidad, la forma como se distribuyen los valores de abundancia en un gráfico (número de pixeles versus abundancia) también entrega información sobre la distribución de la abundancia de un componente. La obtención de datos numéricos a partir de la distribución de los valores de abundancia en este gráfico se realiza mediante la determinación de la curtosis y de la asimetría. En términos generales, la curtosis cuantifica el grado de concentración que presentan los valores de abundancia alrededor de la zona central de la distribución. A su vez, la asimetría es una medida de la desigualdad de la distribución de la abundancia acerca de su media (Lewis, Schoppelrei, Lee, y Kidder, 2007).

En estadística, la medida de curtosis entrega un descriptor de la proporción entre la varianza originada por la combinación de datos extremos respecto a la media, en contraposición con datos pocos alejados de la misma. En resumen, una mayor curtosis implica una mayor concentración de datos muy cerca de la media de la distribución, coexistiendo al mismo tiempo con una relativamente elevada frecuencia de datos muy alejados de la misma. En el caso de la NIR-CI, un alto valor de curtosis puede indicar un pico alto con fuertes caídas y colas significativas, mientras que una curtosis negativa indica un pico plano que resulta de valores de abundancia altamente variables (Amigo et al., 2008; Lewis et al., 2007).

La determinación de la asimetría permite establecer el grado de una distribución de probabilidad de una variable aleatoria sin tener que hacer su representación gráfica. En particular, una distribución es simétrica si existe el mismo número de valores a la derecha que a la izquierda de la media; por tanto, el mismo número de desviaciones con signo positivo que aquellas con signo negativo. En el estudio de imágenes químicas, esto se traduce en que asimetrías positivas significan una muestra con un alto número de áreas de alto contenido de abundancia, mientras que asimetrías negativas, un alto número de áreas de bajo contenido de abundancia. Estos descriptores, curtosis y asimetría, han sido utilizados por varios investigadores para describir la uniformidad de la distribución de la abundancia de un compuesto en una muestra (Amigo et al., 2008; Khorasani, Amigo, Sun, Bertelsen, y Rantanen, 2015; Lewis y Kidder, 2010; Palou et al., 2012).

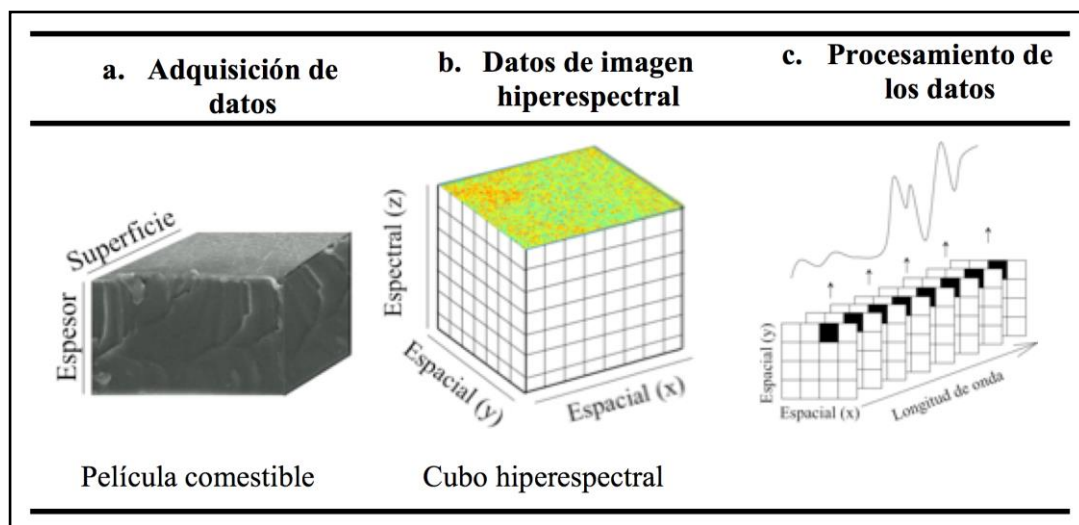


Figura 1-5. Esquema general de la metodología para obtener las imágenes químicas por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR-CI). El proceso de obtención de imágenes químicas consta de tres pasos: **a.** adquisición de los datos que permiten construir la imagen hiperespectral; **b.** disposición de datos de la imagen hiperespectral en un cubo de datos con información espacial en los ejes x e y y con información espectral en el eje z ; **c.** procesamiento de los datos con herramientas estadísticas y quemométricas, pudiendo extraer información de la distribución de abundancias de los componentes químicos individuales que componen la muestra.

Mediante el análisis NIR-CI han sido correlacionadas las propiedades físicas de diversas formas de administración de medicamentos con la distribución y la

abundancia de sus ingredientes. Por ejemplo, Ellison et al. (2008) mostraron que NIR-CI es una herramienta efectiva en el monitoreo de la distribución de principios activos de tabletas farmacéuticas y de su calidad física, mediante la uniformidad de la resistencia de la tableta. Siguiendo la misma línea, Wang et al. (2016) construyeron modelos de correlación entre la dureza y la distribución espacial de tabletas obtenida mediante NIR-CI. Aplicando los mismos principios pero en una nueva forma de administración de medicamentos, Jérez Rozo et al. (2011) utilizaron NIR-CI para caracterizar la distribución espacial, la abundancia del polímero formador y la droga contenida en una delgada película polimérica. Ambos parámetros les permiten monitorear el tamaño de partícula y la aglomeración de la droga, para estimar la velocidad de disolución y la uniformidad de la droga contenida en la película. Estos antecedentes indican que NIR-CI es una técnica que permite estudiar la abundancia y la distribución de los componentes de películas poliméricas. Adicionalmente, es posible sugerir que estos parámetros (abundancia y distribución) podrían estar relacionados con las propiedades físicas de las películas.

1.4 Hipótesis

Existe una correlación entre, por un lado, los parámetros de abundancia y variabilidad de los polímeros formadores de las películas comestibles de quitosano y gelatina, y, por otro, las propiedades mecánicas de las mismas películas.

1.5 Objetivo general

Aportar al conocimiento de las películas comestibles de quitosano y gelatina en función de la adición de plastificantes, mediante su caracterización y la inclusión de la correlación entre, por un lado, la abundancia y la variabilidad de sus polímeros formadores, y, por otro, las propiedades mecánicas de las mismas películas.

1.5.1 Objetivos específicos

- Establecer una metodología para determinar la abundancia y variabilidad de los componentes de las películas comestibles mediante espectroscopia NIR-CI.
- Determinar el efecto de distintos plastificantes en las características morfológicas, físicas y químicas de películas comestibles de gelatina y quitosano por NIR-CI.

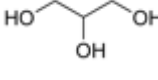
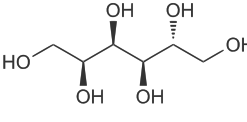
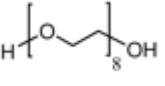
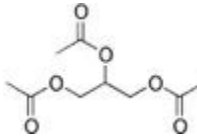
- Correlacionar la abundancia y la variabilidad de los componentes de las películas comestibles, con las propiedades físicas de estas películas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Las soluciones formadoras de películas se fabricaron utilizando gelatina de piel de pescado de agua fría, tales como bacalao, abadejo, eglefino, merluza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), y quitosano de *Pandalus borealis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Como plastificantes se utilizó glicerol ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), sorbitol ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), polietilenglicol 400 (PEG400, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) y triacetina 99% (Acros Organics, Geel, Bélgica) (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Componentes usados como plastificantes en este estudio y sus principales características.

	Glicerol	Sorbitol	PEG400	Triacetina
Estructura molecular				
Nº oxígeno / molécula	3	6	9	6
Masa molar (g/mol)	92	152	400	218
Constante dieléctrica	42,5	33,5	14,1	7,3

Los compuestos utilizados como plastificantes fueron seleccionados por sus diferencias en estructura, características químicas y en peso molecular.

2.2 Métodos

2.2.1 Soluciones formadoras de películas

Las soluciones formadoras de películas se fabricaron disolviendo quitosano en ácido acético al 1%, para alcanzar una concentración de 1,55%p/p. Esta disolución se mezcló con gelatina de piel de pescado al 2,3% y finalmente se adicionó un plastificante a una concentración de 1,16%, o dos plastificantes en una concentración de 0,58% cada uno (Tabla 2-2). Cada solución formadora de la película se agitó hasta alcanzar disolución completa y se agitó continuamente a 45 °C durante 1 h. Para retirar los sólidos

insolubles provenientes del quitosano, las soluciones resultantes (pH promedio de 4,56 $\pm$ 0,07) se filtraron a través de gasa estéril utilizando un matraz kitazato. Finalmente, las soluciones se almacenaron a temperatura ambiente hasta la fabricación de la película comestible correspondiente.

Tabla 2-2. Formulación de las películas comestibles usadas en este estudio.

Componentes	(g/100 g sol.)	Porcentaje (%) ⁽¹⁾
Gelatina	2,3	46
Quitosano	1,55	31
Plastificante⁽²⁾	1,16	23

⁽¹⁾ Corresponde a la división de los gramos de compuesto por los gramos de los componentes totales que forman cada película multiplicado por 100.

⁽²⁾ Plastificantes corresponden a glicerol, sorbitol, PEG400 y triacetina usados ya sea como un único plastificante o una combinación de dos de ellos en una proporción 1:1.

2.2.2 Fabricación de la película

Las películas comestibles se fabricaron mediante la técnica de moldeado de solvente. Alícuotas de 5,4 g de solución formadora de películas se vertieron en placas petri (área de la superficie 24 cm²) y se secaron a 30 °C en un sistema de aire forzado hasta alcanzar masa estable. Después del proceso de secado, se estandarizó el contenido de agua de las películas mediante la exposición dentro de un desecador a humedad relativa y temperatura constante (74 $\pm$ 3% y 25 $\pm$ 2°C, respectivamente) durante 72 h. La humedad relativa se midió en cada experimento mediante un sensor registrador de humedad relativa y temperatura (Fisher Scientific™ Traceable™ Thermometer/Clock/Humidity Monitor).

La determinación del espesor de las películas comestibles se realizó mediante un micrómetro digital (rango de medición 0,000 - 25,000 mm, código E5010109, VETO y Co.). Para cada determinación, se evaluó el espesor de cada película en 10 posiciones distintas. El valor promedio de las 10 mediciones corresponde al valor reportado del espesor de cada película.

2.2.3 Espectroscopía de infrarrojo cercano con imágenes químicas

Para la obtención de las imágenes se utilizó un espectrómetro Malvern Instrument Spectral Dimension SyNIRgi chemical imaging system (Malvern, UK). Se trabajó en la modalidad de arreglo del plano focal (focal plane array, FPA) con un filtro sintonizable de cristal líquido, el cual permite el análisis del campo completo.

Para obtener las imágenes químicas se utilizó el modo de transflectancia, donde el haz de luz atraviesa la muestra y se refleja en un reflector que está en contacto con la misma, hasta de nuevo llegar al detector (Alcalà-Bernárdez 2006). Para ello, se colocaron las películas comestibles sobre un disco de cerámica blanca con un diámetro de 28 mm, que se usó como referencia para el sistema de adquisición. Las imágenes se analizaron con un objetivo 40X y se formaron por 320 x 256 pixeles continuos (1 píxel = 1600 μm^2) con un rango espectral de 1200 a 2400 nm (81920 pixeles en el área espectral).

El procesamiento de los datos y el análisis de las imágenes se realizó mediante el software Malvern ISys 5.0 cross-platform chemical imaging analysis (Susarla et al., 2013). Los datos obtenidos se dispusieron en un cubo hiperespectral de datos conformado por tres vías **X** (Figura 1-5): *X* e *Y* con información espacial y λ con información espectral. La información contenida en el hipercubo se sometió a una corrección de la línea base y una normalización para corregir efectos de la dispersión de la luz (Sacré et al., 2014). Para normalizar todos los pixeles, se utilizó el pretratamiento variable normal est andar (standard normal variable, SNV). Para obtener gráficos con menores dispersiones se realizó una modificación del método de Savitzky-Golay, que consiste en obtener la segunda derivada suavizada a partir de la segunda derivada del ajuste polinomial. Como consecuencia, la función resultante fue similar a los datos de entrada, pero suavizada. Para mejorar la precisión de cuantificación y reducir el error causado por la dispersión, se utilizó la segunda derivada Savitzky-Golay con longitud de 11 y orden 3 (Alexandrino y Poppi 2013).

El análisis de imágenes y los tratamientos cuantitativos espectrales que permiten predecir las abundancias de los compuestos se obtuvieron mediante el software

Malvern ISys 5.0 cross-platform chemical imaging analysis, con rutinas desarrolladas en código Matlab. El software Malvern ISys 5.0 permitió la construcción de algoritmos mediante regresión de mínimos cuadrados parciales análisis discriminante (PLS-DA) obteniendo la distribución de los componentes en las películas y su abundancia. La PLS-DA es un acercamiento más práctico del método PLS, ya que describe la concentración de los componentes de muestra teniendo en cuenta los espectros de la muestra y los espectros de los ingredientes puros, pero no necesariamente la concentración de todos los ingredientes de la muestra. Por lo tanto, los espectros de los compuestos puros que forman las películas estudiadas se utilizaron para construir una librería con la que se cuantificó la abundancia de cada componente en las películas comestibles (Juan et al., 2004).

Cada librería estuvo compuesta por el mismo número de elementos que conforman la película analizada, lo que permitió fijar el número óptimo de factores utilizados en la calibración de los modelos. Esto se debe a que cada nuevo factor o variable latente añadida al modelo (variables que no están correlacionadas entre sí) describe una menor variación sistemática de los espectros y una mayor variación aleatoria. Para fijar el umbral que permite ajustar los límites para diferenciar entre las distintas clases, se utilizaron las variables de similitud entre el espectro de cada componente puro y las de los otros componentes cuantificados y la cantidad de factores (Palou et al., 2012). La aplicación del modelo resultante permitió normalizar el dato espectral en una imagen basada en una escala de 0 a 1. Esta escala corresponde a una concentración de 0 a 100% de cada componente en cada pixel de la imagen. Como resultado final de esta metodología se obtuvo una imagen de la distribución química, la abundancia para cada uno de los componentes de las películas y los histogramas de la distribución de los compuestos en las imágenes. Los valores reportados para estudiar la variabilidad de la distribución de la película son la desviación estándar, la curtosis y la asimetría.

2.2.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Los espectros de FTIR de películas comestibles se obtuvieron mediante un espectrómetro Nicolet 560 FTIR acoplado a un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR, por su nombre en inglés) con un cristal de ZnSe de reflexión única (MIRacle,

Pike Technologies). Las muestras se midieron en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} . La resolución de los espectros FTIR se obtuvo en un rango de 4 cm^{-1} y el espectro final corresponde a un promedio de 100 escaneos.

2.2.5 Microscopía electrónica de barrido

La caracterización de la microestructura de las películas comestibles se determinó mediante un microscopio electrónico de barrido (Amray 1830I, aceleración potencial de 20 kV). Antes de cada medición, las películas se deshidrataron durante 72 horas en un desecador; posteriormente, se montaron en una matriz cilíndrica de 10 mm de diámetro, usando una cinta adhesiva de doble faz, y luego se revistieron por un bombardeo iónico de Oro/Paladio durante 120 segundos a 30 mA en un revestidor de pulverización catódica.

2.2.6 Determinación del contenido de agua

El contenido de agua para cada película se determinó gravimétricamente después del proceso de secado, calculando la diferencia entre el peso de la película y la cantidad de sólidos dividido por el peso seco de la película.

2.2.7 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimétricamente usando el “método del vaso” descrito por Gennadios et al. (1994) con algunas modificaciones (Figura 2-1). Las películas comestibles se cortaron y montaron en vasos de vidrio con un área de transferencia de $2,01 \times 10^{-4} \text{ m}^2$. Este vaso contenía una solución saturada de fosfato monoamónico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), solución que permite alcanzar humedades relativas de 93 % (Sigma–Aldrich Corp., MO, USA). Se utilizó silicona para vacío para impedir el paso de oxígeno por lugares inespecíficos entre el vaso analítico y la película. Luego que cada vaso fue pesado, se colocó en un desecador a 25°C que contenía una solución salina saturada de cloruro de sodio (Spectrum Chemical Manufacturing Corp., NJ, USA), que permite estabilizar la humedad relativa a 72%. Para disminuir la variabilidad entre las mediciones, el lado de la película en contacto con la placa Petri durante su formación siempre se colocó en contacto con la parte del vaso analítico con alta humedad relativa. Cada vaso con la película se pesó cada 2

horas por 3 días. Para determinar la tasa de transmisión de vapor de agua (TTVA), se utilizó la ecuación 2.1, la cual es la división entre la pendiente de la curva de pérdida de peso (S) y el área de transferencia de la película comestible (A) (Gennadios et al., 1994), donde las unidades de S y A son g/día y m², respectivamente.

$$TTVA = S/A \quad (2.1)$$

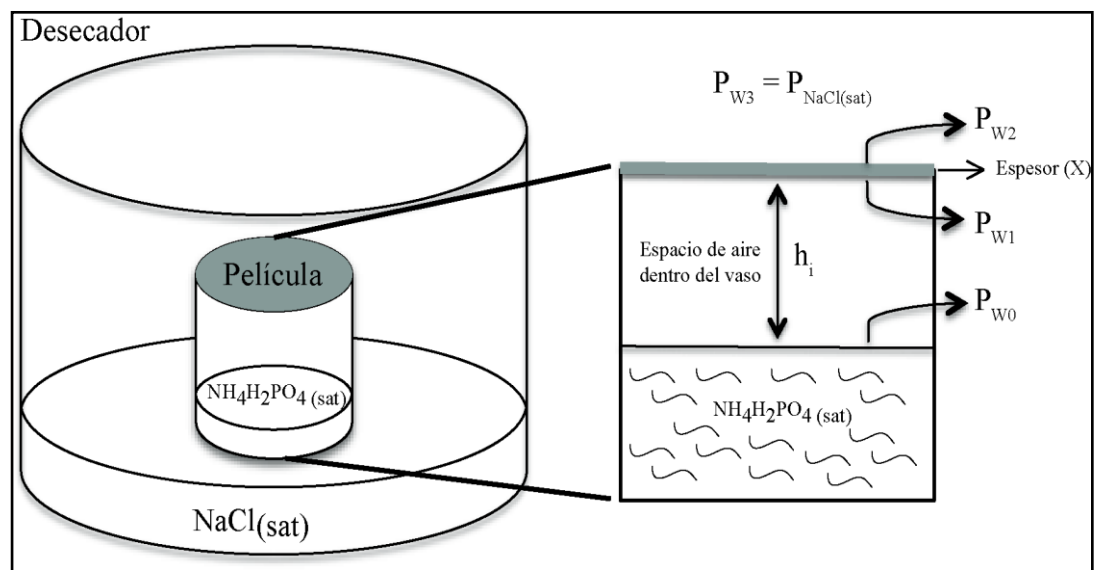


Figura 2-1. Diagrama esquemático de la medición de la permeabilidad al vapor de agua, indicando los valores de presión de vapor de agua. P_{w0} , P_{w1} , P_{w2} y P_{w3} son las presiones parciales en la superficie de la solución saturada de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en el vaso analítico, bajo la película comestible, en la superficie externa de la película y en la superficie de la solución saturada de cloruro de sodio, respectivamente.

Mchugh et al. (1993) y Gennadios et al. (1994) determinaron que las capas de aire que se encuentran sobre y bajo la película montada en el vaso de medición implican una resistencia significativa al transporte de agua. Para incorporar este efecto del aire sobre y bajo la película al valor de PVA, se utilizó la metodología propuesta por Gennadios et al. (1994). Mediante ella se determinaron los valores de la tasa de transmisión de vapor de agua corregidos ($TTVA_c$, Ecuación 2.2),

$$TTVA_c = TTVA * \left(\frac{pw_3 - pw_0}{pw_2 - pw_1} \right) \quad (2.2)$$

donde Pw_0 , Pw_1 , Pw_2 y Pw_3 son las presiones parciales en la superficie de la solución saturada de $NH_4H_2PO_4$ en el vaso analítico, bajo la película comestible, en la superficie externa de la película y en la superficie de la solución saturada de cloruro de sodio, respectivamente. Finalmente, el valor de la permeabilidad al vapor de agua corregido (PVA_c) se calculó mediante la ecuación 2.3:

$$PVA_c = \frac{TTVA_c \cdot X}{pw_3 \cdot pw_0} \quad (2.3)$$

2.2.8 Propiedades mecánicas

Se determinó la resistencia a la tracción (RT), el porcentaje de elongación (%E) y el módulo elástico (ME) en tiras de 5 x 55 mm de cada película comestible. Las muestras se montaron y se ajustaron con agarres en un equipo de medición de propiedades mecánicas MTS Sintech/5D Universal (MTS SYSTEMS, MN, USA). La separación de los agarres se configura a 34 mm y las películas se estiran a una velocidad constante de 10 mm/min a 25°C hasta su ruptura. Se utilizó una célula de carga de 100 N para reducir los efectos de relajación durante el ensayo (Bedoui et al., 2012).

La resistencia a la tracción [MPa] se calculó dividiendo la carga máxima [N] requerida para romper la muestra por el área de la sección transversal [m²] de la película comestible. Para obtener el valor de porcentaje de elongación (%E), se dividió la longitud en el punto de ruptura por el largo inicial de la prueba y se multiplicó por 100. Finalmente, el módulo elástico se obtuvo dividiendo la tensión por la deformación considerada de 0 a 5% (Figura 1-4). Cada valor de las propiedades mecánicas es un promedio de 5 repeticiones.

2.2.9 Análisis estadístico

Para la determinación de diferencias estadísticas se utilizó análisis de varianza (factorial) a las variables respuesta, con valor- $p \leq 0,05$, usando Statgraphics® Plus para Windows, versión 4,0 (StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA, USA). Se utilizó

el método de regresión lineal múltiple (MLR) para evaluar la correlación entre la abundancia de los componentes, la variabilidad de la abundancia (ambas variables independientes) y las propiedades mecánicas (variable dependiente) de las películas comestibles. Los coeficientes de correlación (R^2), los valores p del modelo y variables por separado, y los coeficientes de los modelos se calcularon usando StatPlus®:mac versión 5.8.2.0/Universal (AnalystSoft Inc, DC, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de la abundancia y variabilidad de los componentes de las películas comestibles mediante NIR-CI

3.1.1 Descripción de espectros

El primer paso del proceso de calibración del método consistió en una rigurosa evaluación de los espectros IR de los compuestos utilizados para fabricar las películas. En particular, la Figura 3-1a muestra los espectros de los componentes puros, mientras que la Figura 3-1b muestra los espectros pretratados con variable normal estándar (SNV) y segunda derivada Savitzky-Golay.

Según la literatura, las bandas bajo los 2200 nm de los espectros NIR de proteínas se asocian al estiramiento y la unión de grupos NH; en cambio, las bandas sobre los 2200 nm corresponden a los estiramientos y la unión de los grupos CH (Segtnan y Isaksson 2004). En nuestros resultados, la gelatina muestra bandas características a 1720 nm, asociada al primer sobretono de las vibraciones del estiramiento del grupo CH; 2160 nm, correspondiente al estiramiento NH de los grupos amida B más el grupo amida II; y 2260 nm atribuida al estiramiento de los grupos CH₂ y CH₃. Todas estas bandas concuerdan con lo expuesto en reportes anteriores (Wang et al. 1994; Segtnan y Isaksson 2004).

Por otro lado, la espectroscopía NIR es un método apropiado para determinar los grupos O-H y N-H presentes en la estructura del quitosano (Rathke y Hudson, 1993). En relación con los espectros obtenidos, el quitosano arrojó bandas de intensidades relativas a 1520, 1720 y 2020 nm. En particular, la banda a 2020 nm se interpreta como una combinación del estiramiento de frecuencia de la amida II simétrica NH y del segundo sobretono de la frecuencia de estiramiento del enlace C=O; 1720 nm (Kasaai, 2010). Las bandas a 1520 y 1720, en su conjunto, se relacionan al grupo hidroxilo y el grupo amino de la molécula de quitosano (Figuras 3-1a y 3-1b) (Cervera et al., 2011).

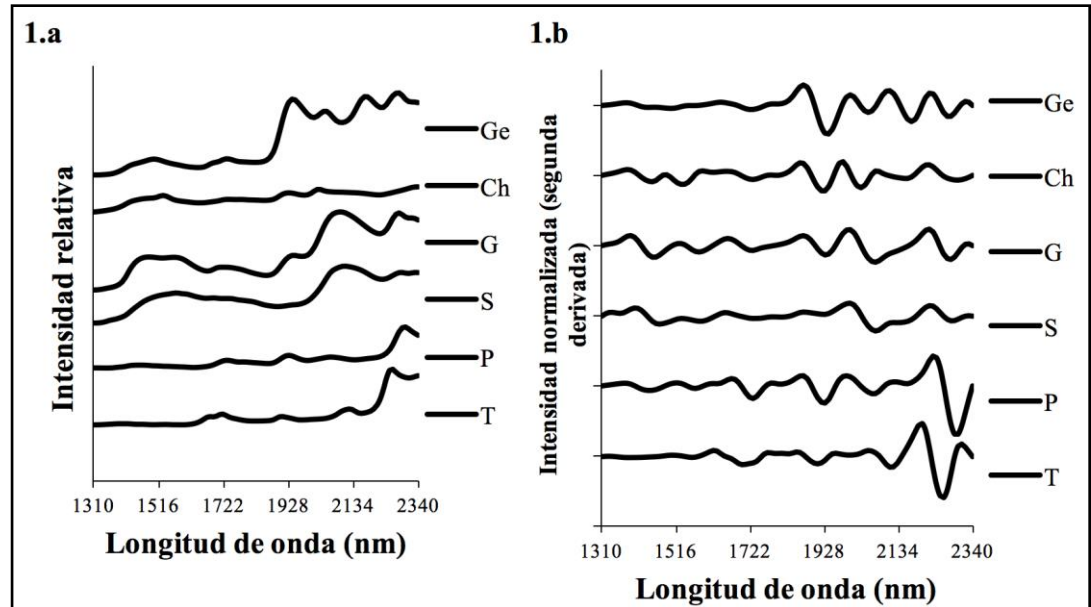


Figura 3-1a: Espectros NIR de los componentes puros usados para fabricar las películas comestibles. Figura 3-1b: Espectros NIR de los compuestos puros con el promedio de la segunda derivada después del proceso de normalización. Los espectros NIR fueron adquiridos promediando los espectros de cada pixel en un área de la imagen hiperespectral. Ge: gelatina, Q: quitosano, G: glicerol, S: sorbitol, P: PEG400, T: triacetina.

Fue posible predecir la abundancia de gelatina y quitosano en las películas comestibles debido a las marcadas diferencias entre los espectros puros de gelatina y quitosano. Esta diferencia permitió la elaboración de imágenes de la distribución de los polímeros formadores de la película con las puntuaciones generadas de los modelos de calibración (Lewis y Kidder 2010). Las diferencias obtenidas en todo el rango espectral se confirman por el bajo valor de correlación de sus espectros (Tablas 3-1 y 3-2).

Tabla 3-1: Coeficientes de correlación entre los espectros NIR promedio de los compuestos puros en toda la región espectral.

	Gelatina	Quitosano	Glicerol	Sorbitol	PEG400	Triacetina
Gelatina	1					
Quitosano	0,732	1				
Glicerol	0,694	0,752	1			
Sorbitol	0,509	0,643	0,909	1		
PEG400	0,538	0,501	0,475	0,362	1	
Triacetina	0,453	0,346	0,452	0,396	0,812	1

Tabla 3-2: Coeficientes de correlación entre los promedios de los espectros NIR pre-tratados con variable normal estándar y un suavizado con segunda derivada Savitzky-Golay para toda la región espectral.

	Gelatina	Quitosano	Glicerol	Sorbitol	PEG400	Triacetina
Gelatina	1					
Quitosano	0,323	1				
Glicerol	0,192	0,292	1			
Sorbitol	0,026	0,110	0,705	1		
PEG400	0,191	0,285	0,362	0,147	1	
Triacetina	2,1E-4	2,5E-2	8,2E-2	1,6E-3	6,0E-4	1

Las similitudes entre los espectros puros de glicerol y sorbitol dificultaron su predicción de abundancia en la formulación en que ambos fueron adicionados (Figuras 3-1a y 3-1b y Tabla 3-1). De igual modo, esta similitud podría influir en la determinación de los valores de abundancia de quitosano. Los grupos OH de ambos compuestos son los responsables de bandas intensas de sobretono entre los rangos 1400 – 1450 nm y bandas de combinación entre 1900 – 1940 nm de longitud de onda de los espectros de NIR (Chen et al., 2004). Estas bandas son atribuidas principalmente al estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos OH (Boada-Lopez et al., 2013). El glicerol y el sorbitol están formados por un esqueleto de carbono con grupos OH

(Tabla 2-1), grupos que también presenta el quitosano en su estructura. La aplicación de la normalización con variable normal estándar (SNV) y un suavizado de segunda derivada Savitzky-Golay permitieron disminuir el coeficiente de correlación entre ambos espectros ($R^2 = 0,705$, evaluado en todo el rango espectral, Tabla 3-2), con lo cual fue posible obtener valores de abundancia de quitosano sin el efecto de la similitud de los espectros de glicerol y sorbitol.

3.1.2 Distribución de abundancia

Una vez obtenida la abundancia total de las películas, esta fue corregida por su contenido de agua (Tabla 3-3). El método PLS-DA determinó la abundancia y la desviación estándar total de los componentes de las películas. Sin embargo, el método de espectroscopía NIR es extremadamente sensible a la absorbancia del grupo OH. Esto sugiere que las moléculas de agua presentes en las películas ejercen, por un lado, un aumento de la abundancia total de los componentes en las muestras que presenten plastificantes con grupos OH en su estructura (películas con glicerol, sorbitol o PEG400), mientras que, por otro, una disminución de la abundancia total de los componentes en las muestras que presenten plastificantes sin grupos OH en su estructura (películas control y triacetina) (Tabla 2-1). Como consecuencia, la corrección consistió en restar la cantidad de agua en las películas con glicerol, sorbitol y PEG400 y, en la película control y con triacetina, en sumar el contenido de agua (en ambos casos el contenido de agua fue determinado mediante gravimetría). Al corregir los valores de abundancia total de las películas comestibles por su contenido de agua, fue posible obtener valores totales de abundancia más cercanos al 100% y con menor variabilidad.

Tabla 3-3: Valores de abundancia total de los componentes de las películas comestibles corregidos y no corregidos por el agua presente en las películas.

	Abundancia total no corregida		Abundancia corregida				Abundancia total corregida	
			Gelatina		Quitosano			
	(%)	STD	%	STD	%	STD	(%)	STD
C	86,9	5,3	74,9	3,9	12,1	3,6	103,0	3,6
G	106,6	5,6	73,5	3,1	5,9	3,8	97,1	3,0
S	111,9	6,1	76,2	3,5	12,3	4,2	105,7	3,6
P	107,1	7,2	78,3	4,9	10,0	4,5	98,7	4,7
T	95,0	3,4	62,7	2,0	18,9	2,4	100,5	2,0
G + S	92,6	10,2	66,6	3,7	4,1	4,3	84,9	3,5
G + P	112,1	6,4	78,6	3,2	4,7	3,8	103,1	3,2
G + T	106,8	4,6	64,1	2,8	16,3	2,7	106,8	2,6
S + P	115,0	6,0	79,4	3,3	9,0	3,5	99,0	3,3
S + T	107,3	4,9	66,7	3,1	18,4	2,8	107,3	2,9
P + T	103,6	4,2	65,4	2,4	20,5	2,1	103,6	2,3
Promedio	105,2	5,2					100,9	3,2

Película sin plastificante (C); película con glicerol (G); película con sorbitol (S); película con PEG400 (P) y película con triacetina (T). STD significa desviación estándar. El signo “+” significa la adición de dos plastificantes en las películas de gelatina y quitosano. Los valores de abundancia total para cada película corresponden a la suma de la abundancia de los componentes de la película. La desviación estándar total de cada película se calculó mediante la suma de las desviaciones estándar al cuadrado multiplicado por el porcentaje de cada compuesto presente en la película.

Las imágenes químicas y los histogramas de los componentes de las películas muestran cómo se distribuyen los componentes a través de la película comestible. El color rojo en las imágenes es indicativo de las áreas de alta abundancia del componente, mientras que el color azul es indicativo de áreas de baja abundancia. Los histogramas fueron usados para evaluar la distribución de los valores de abundancia obtenidos entregando un estimado de la heterogeneidad de cada película. El máximo valor (centro de la curva) del histograma de cada compuesto corresponde al valor de abundancia más repetido en el análisis de toda la película. El cálculo de los valores de

curtosis y asimetría describe la desviación de los valores de abundancia respecto a una distribución normal. Para el caso de películas sin plastificantes, la gelatina y el quitosano mostraron valores negativos de curtosis y asimetría, pero cercanos a cero (Figura 3-2a). En particular, la asimetría indica que la gelatina presenta un mayor número de dominios de baja abundancia que el quitosano. Asimismo, en la tabla 3-3 se puede apreciar que el valor de desviación estándar de gelatina es levemente mayor que el valor de quitosano. Mediante estos resultados, se concluye que la gelatina presenta una distribución más heterogénea que el quitosano.

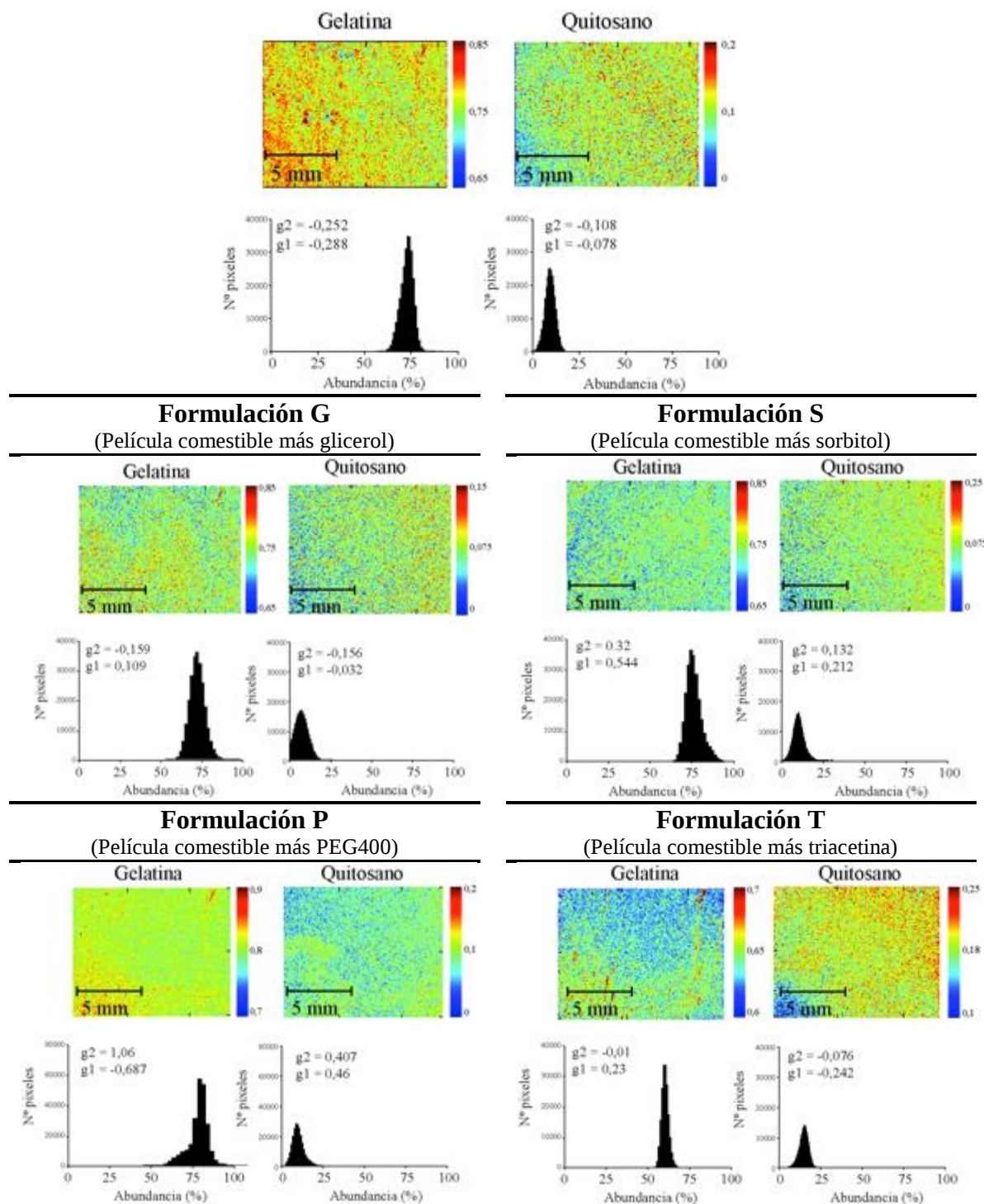


Figura 3-2: Imágenes químicas de la distribución de la abundancia y sus correspondientes histogramas de los polímeros que forman las películas comestibles. Los valores de curtosis (g^2) y asimetría (g^1) de los histogramas se usaron para estudiar la distribución de los componentes de las películas. La barra lateral en cada imagen muestra la intensidad de los componentes de cada pixel. El color rojo indica alta intensidad del compuesto en cada pixel; en cambio, el color azul indica baja intensidad.

Cada imagen corresponde a una película comestible y los valores corresponden a un triplicado de cada condición estudiada.

Mediante la adición de glicerol a las películas, los valores de curtosis de gelatina y quitosano varían levemente, manteniendo su signo negativo y, por lo tanto, su grado de uniformidad (Figura 3-2b). Sin embargo, el valor de asimetría de gelatina aumentó y cambió de signo, mientras que la asimetría de quitosano mantuvo su signo negativo. Esto implica que el glicerol genera un aumento de sitios de alta abundancia de gelatina sin modificar los sitios del quitosano. El glicerol disminuyó el valor de la variabilidad de abundancia de gelatina, pero aumentó la del quitosano (Tabla 3-3). Con estos resultados y comparando con la película control, se concluye que la adición de glicerol aumenta los dominios de alta abundancia de gelatina, mientras que la distribución de quitosano varía levemente.

En las películas con sorbitol, los valores de curtosis y asimetría de gelatina y quitosano fueron mayores a cero, siendo mayores los cambios en la gelatina (Figura 3-2c). Específicamente, los cambios en los valores de asimetría indican que los polímeros mostraron un incremento en los dominios de alta abundancia, particularmente gelatina. Por otro lado, los cambios de curtosis de ambos polímeros mostraron que la adición de sorbitol provoca películas con distribución de polímeros menos homogéneas que la película control. La reducción de la homogeneidad en la distribución de los polímeros sugiere que el sorbitol interactúa con ambos polímeros.

Los histogramas de gelatina de las películas que incluyeron PEG400 mostraron el valor de asimetría más negativo y el mayor valor de curtosis obtenido en nuestros experimentos (Figura 3-2d). Esto indica que la gelatina exhibe baja presencia de dominios de alta abundancia, generando menor uniformidad en la distribución de los componentes (Lewis et al., 2007). Específicamente, el valor negativo de asimetría indica una reducción de dominios de alta abundancia de gelatina. Por otro lado, el valor positivo de la curtosis de la película indica que la gelatina presenta una distribución heterogénea. Esta información sugiere que PEG400 presenta una alta interacción con quitosano, pero una baja interacción con gelatina.

En las películas con triacetina, la curtosis y la asimetría de gelatina y quitosano mostraron los valores más cercanos a cero (Figura 3-2e). Esto implica que estas películas presentaron la distribución más simétrica y estrecha de sus componentes (Lewis et al., 2007). Además, las películas adicionadas con triacetina mostraron la menor variabilidad en la abundancia total (Tabla 3-3). Lo anterior se debe a que la triacetina es una molécula con baja polaridad, a diferencia de la gelatina y el quitosano, que presentan una alta polaridad. Por lo tanto, es posible sugerir que la triacetina presenta baja interacción con los polímeros formadores de la película.

La abundancia de gelatina y quitosano varió en función de la adición de plastificantes, considerando que las películas fueron fabricadas con la misma concentración de ambos polímeros (Figura 3-3). NIR-CI utiliza la similitud de los espectros de los compuestos puros para identificar (cuantitativa y cualitativamente) cada componente en la muestra estudiada (Palou et al., 2012). Cuando existe un cambio conformacional del componente estudiado, gatillado por la interacción con otro compuesto, ocurre un cambio en el espectro. Por lo tanto, la mayor reducción de la abundancia de gelatina observada en las películas que fueron tratadas con triacetina sugiere que ésta interacciona principalmente con la gelatina, aunque esta interacción es baja. Concordante con esto, también se concluye que el glicerol interactúa principalmente con el quitosano.

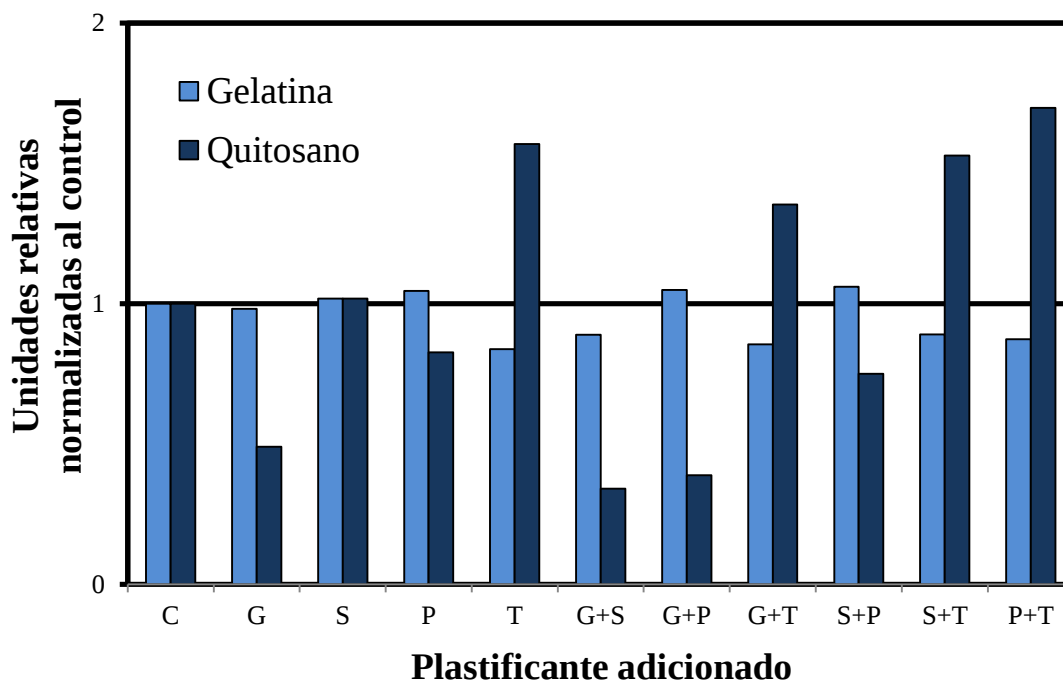


Figura 3-3: Valores de abundancia de gelatina y quitosano corregidos por el contenido de agua de las películas y normalizados respecto a los valores de abundancia de gelatina y quitosano de la película control. Película sin plastificante (C); película con glicerol (G); película con sorbitol (S); película con PEG400 (P) y película con triacetina (T). El signo “+” significa la adición de dos plastificantes en las películas de gelatina y quitosano.

3.2 Determinación del efecto de plastificantes en las características morfológicas, físicas y químicas de películas comestibles de gelatina y quitosano

3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de reflexión adquiridos mediante FTIR contribuyen a la caracterización de las interacciones entre los grupos funcionales del quitosano y la gelatina con el glicerol, el sorbitol, el PEG400 y la triacetina (Figura 3-4).

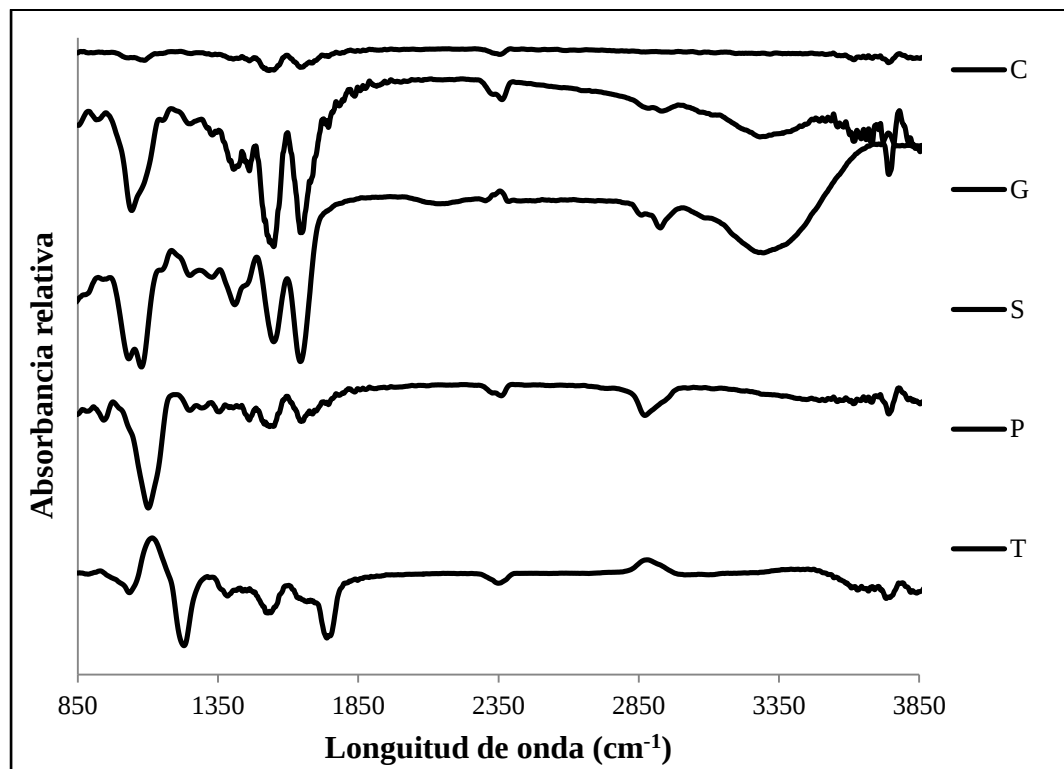


Figura 3-4: Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas comestibles de gelatina y quitosano sin plastificantes adicionado (C) y adicionadas con glicerol (G), sorbitol (S), PEG400 (P) y triacetina (T).

Para comenzar el análisis, se evaluaron las bandas características del espectro control de la película comestible en base a quitosano y gelatina (sin plastificante). Estas bandas fueron observadas en 1649 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento en el grupo amida I de $\text{C}=\text{O}$ en $-\text{C}=\text{ONH}-$ y a las vibraciones de tensión del grupo N-H y en 1542 cm^{-1} obedeciendo al cambio del ángulo de estiramiento de $-\text{C}=\text{ONH}-$, ambas en el grupo amida II (Liu et al., 2012). No obstante, en películas plastificadas con polioles (glicerol y sorbitol), la banda que representa el pico de absorbancia para la amida II mostró una mayor intensidad que la película control y un desplazamiento a menor longitud de onda de la banda característica de vibración para el grupo amida II (desde 1542 cm^{-1} a 1536 cm^{-1} para glicerol y 1532 cm^{-1} para sorbitol) (Figura 3-5). Esto indica que la interacción entre los polímeros y las moléculas plastificantes en la película se realiza mediante enlaces de hidrógeno. Más aún, el cambio a una longitud de onda inferior en los espectros FTIR es indicador de que los polioles estarían interactuando con

quitosano. Estas nuevas interacciones estarían sustituyendo las interacciones entre el ácido acético y los grupos amida de quitosano (Matet, Heuzey, Pollet, Ajji, y Averous, 2013).

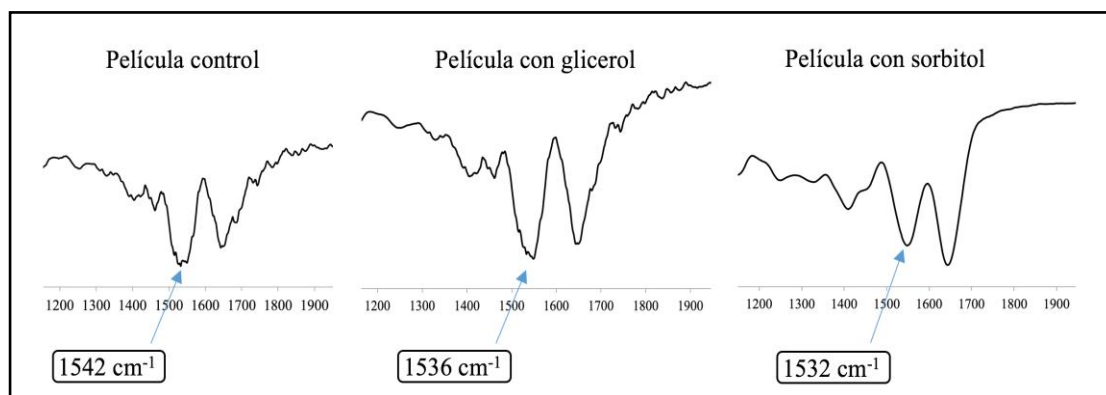


Figura 3-5. Aumento de la zona de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas comestibles de gelatina y quitosano control (sin plastificantes), adicionadas con glicerol y adicionadas con sorbitol que evidencian el movimiento de bandas que corresponden al cambio del ángulo de estiramiento de C=ONH.

La adición de la triacetina desplaza a menores longitudes de onda las bandas características de la gelatina pero no las del quitosano, sugiriendo que la triacetina interacciona mayormente con la gelatina. La gelatina sin plastificante presenta bandas características a 1523 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} , las cuales fueron desplazadas a 1517 cm^{-1} y 1629 cm^{-1} en los espectros de las películas adicionadas con triacetina. Sin embargo, las bandas características de quitosano a 1365 cm^{-1} y 1519 cm^{-1} no se desplazaron (Figura 3-6). El espectro de la película adicionada con triacetina muestra un pico a 1218 cm^{-1} , que puede ser atribuido a la presencia de nuevas interacciones mediante fuerzas de van der Waals entre los grupos alcóxidos de la triacetina y grupos ésteres de la gelatina (Zhu, Li, Huang, Chen, y Li, 2013). Este antecedente refuerza la evidencia de que la triacetina interacciona con la gelatina para ejercer su efecto plastificante.

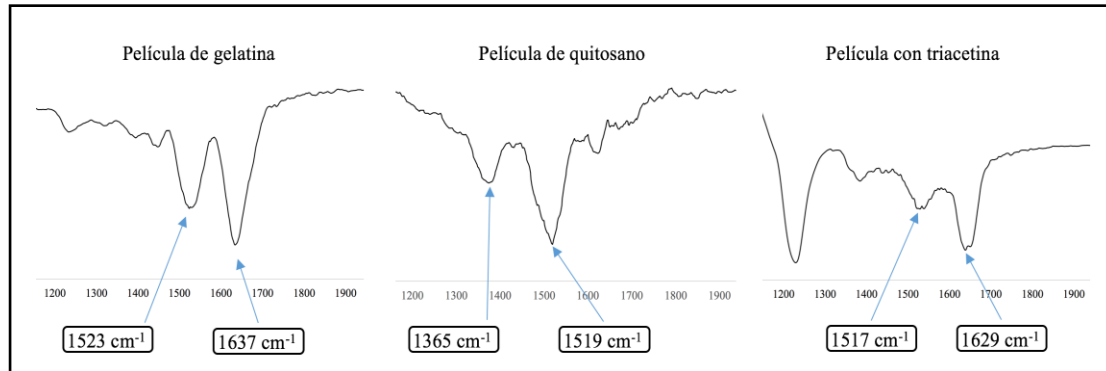


Figura 3-6. Aumento de la zona de los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) de las películas de la gelatina, del quitosano y de la película de gelatina, quitosano y triacetina que evidencian el desplazamiento de ciertas bandas producto de la adición de triacetina.

El glicerol y el sorbitol interaccionan con los polímeros formadores de la película mediante enlaces de hidrógeno, mientras que el PEG400 no forma tales enlaces (Figura 3-4). En los espectros de FTIR existe una banda aproximadamente a los 3200 cm^{-1} atribuida al estiramiento del grupo O-H (Martínez-Camacho et al., 2010). Por lo tanto, la aparición de esta banda en los espectros FTIR es característica de muestras con un aumento de enlaces de hidrógeno y moléculas de agua y polioles en la muestra. En nuestros resultados, dicha banda característica del estiramiento O-H se observó en los espectros de películas adicionadas con glicerol y sorbitol, pero no en los espectros de películas con PEG400 y triacetina. El glicerol y el sorbitol se caracterizan por ser donantes y receptores de enlaces de hidrógeno. En este caso, se debe a que estos compuestos donan protones a los grupos carbonilos y aceptan protones de los grupos OH y NH provenientes principalmente del quitosano (Domján, Bajdik, y Pintye-Hódi, 2009). Por lo tanto, en las películas plastificadas con ambos compuestos aumenta el número de enlaces de hidrógeno. No obstante, PEG400 solo puede actuar como receptor de enlace de hidrógeno, compitiendo con los grupos carbonilo y disminuyendo la densidad de enlaces de hidrógeno en la película de quitosano y gelatina. Estos resultados refuerzan la evidencia de que el glicerol y el sorbitol interaccionan principalmente con el quitosano y que esta interacción está dada por enlaces de hidrógeno. Adicionalmente, este resultado permite clasificar como

plastificantes internos al glicerol y al sorbitol, mientras que al PEG400 como plastificante externo, ya que no forma tales enlaces (Domján et al., 2009).

Ciertas bandas que se observan entre el rango de $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ que corresponden a radicales carbonilo y amino aumentaron en los espectros de películas poliméricas adicionadas con polioles. Pereda et al. (2011) atribuyen el aumento de la intensidad de estas bandas a una interacción electrostática de plastificantes tipo polioles con los radicales carbonilo y amino, produciendo complejos polielectrolíticos entre el quitosano y la gelatina. Este comportamiento está acorde con los resultados obtenidos.

3.2.2 Microestructura

La Figura 3-7 muestra imágenes obtenidas mediante SEM que se utilizaron para estudiar la microestructura de las películas en base a quitosano y gelatina adicionadas con plastificantes.

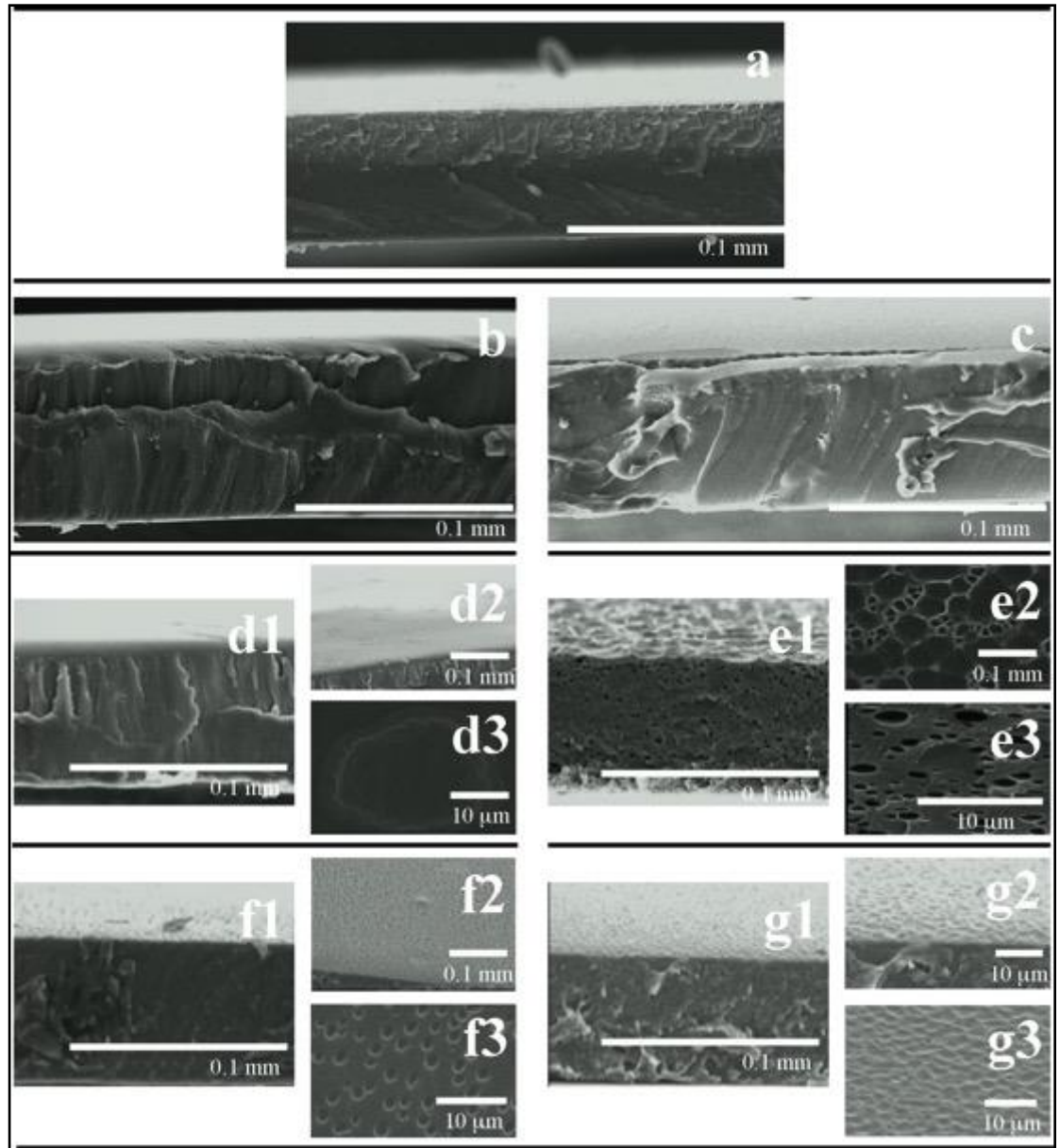


Figura 3-7: Imágenes de la superficie y secciones transversales obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de películas comestibles de gelatina y quitosano: a) sin plastificantes (control); b) glicerol; c) sorbitol; d1) PEG400; e1) triacetina; f1) glicerol y triacetina; y g1) sorbitol y triacetina, todas en una magnificación de 500X. Las imágenes d2 y d3 corresponden a la película con PEG400 en magnificación de 214X y 1500X, respectivamente. Las imágenes e2 y e3 corresponden a la película con triacetina en magnificación de 500X y 5000X, respectivamente. Las imágenes f2 y f3 corresponden a la película con glicerol y triacetina en magnificación de 500X y 2000X respectivamente. Finalmente, las imágenes g2 y g3 corresponden a la película con sorbitol y triacetina, ambos en magnificación de 1000X.

La imagen 3-7a muestra un corte de la sección transversal de la película comestible control (sin la adición de plastificantes), en la cual se observa una microestructura compacta y regular indicando una alta interacción entre la gelatina y el quitosano (A. N. Wang et al., 2011). En el caso de las películas adicionadas con glicerol o sorbitol, también se observó una microestructura compacta y sin imperfecciones visibles (Figura 3-7b y 3-7c). Estas características microestructurales corroboran la alta afinidad que presentaron los componentes de las películas conformadas por la gelatina, el quitosano y los polioles.

Las películas adicionadas con PEG400 presentaron una superficie continua, libre de rupturas pero con la presencia de microestructuras circulares (Figura 3-7d1, d2 y d3). Junto con esto, en las imágenes de la sección transversal de estas películas se observó una leve discontinuidad de la estructura (3-7d1 y d2). Es posible que estas estructuras circulares correspondan a PEG400 libre que precipitó, producto de una incompleta interacción con los polímeros formadores (gelatina y quitosano). La adición en exceso de PEG400 a la solución formadora de la película, junto con las diferencias en las constantes dieléctricas (Tabla 2-1), formarían estas microestructuras precipitadas de plastificante.

Las películas adicionadas con triacetina presentaron superficies cubiertas de poros “tipo cráteres” (Figura 3-7e1 y 3-7e2). Esta microestructura irregular no fue observada en las otras películas analizadas. Los poros tipo cráteres han sido observados en películas comestibles de açaí conteniendo polifenoles de cáscara de manzana y aceite esencial de tomillo (Espitia et al., 2014). Los autores atribuyen la formación de estos poros a la aglomeración de polifenoles de cáscara de manzana o gotas remanentes de aceite esencial. Sin embargo, se sugiere que los dobles enlaces presentes en la estructura de la triacetina, además de su baja polaridad (Tabla 2-1), son las características que llevan a formar películas de gelatina y quitosano con poros.

La adición de compuestos polares (glicerol, sorbitol y PEG400) aumentó significativamente el espesor de las películas respecto a la película control (valor- $p < 0,005$) (Tabla 3-4). En particular, el compuesto con mayor polaridad (glicerol) generó las películas con mayor espesor, aumentando un 66,3% el espesor respecto a la

condición control. La adición de plastificantes polares genera un aumento de moléculas de agua en las películas, implicando un aumento en su espesor. Es por esto que existe una alta correlación entre el espesor de las películas con plastificantes y el contenido de agua ($R^2 = 0,742$; valor-p = 0,0009) (Figura 3-8).

Tabla 3-4: Valores de espesor y contenido de agua de la película comestible control y adicionada con plastificantes.

	Espesor (μm)	Contenido agua (%)
C	90,8 ^a	7,0 ^a
G	151,0 ^e	34,1 ^h
S	129,3 ^d	31,3 ^g
P	113,5 ^c	27,0 ^{ef}
T	93,8 ^{ab}	18,5 ^b
G+S	111,5 ^c	23,7 ^{cd}
G+P	117,8 ^{cd}	25,4 ^{de}
G+T	119,0 ^{cd}	28,4 ^f
S+P	113,8 ^c	22,4 ^c
S+T	111,3 ^c	26,9 ^{ef}
P+T	105,5 ^{bc}	27,0 ^{ef}

Las letras que figuran en la parte superior de los valores de espesor y contenido de agua muestran aquellos valores que presentan diferencias significativas (valor-p < 0,05).

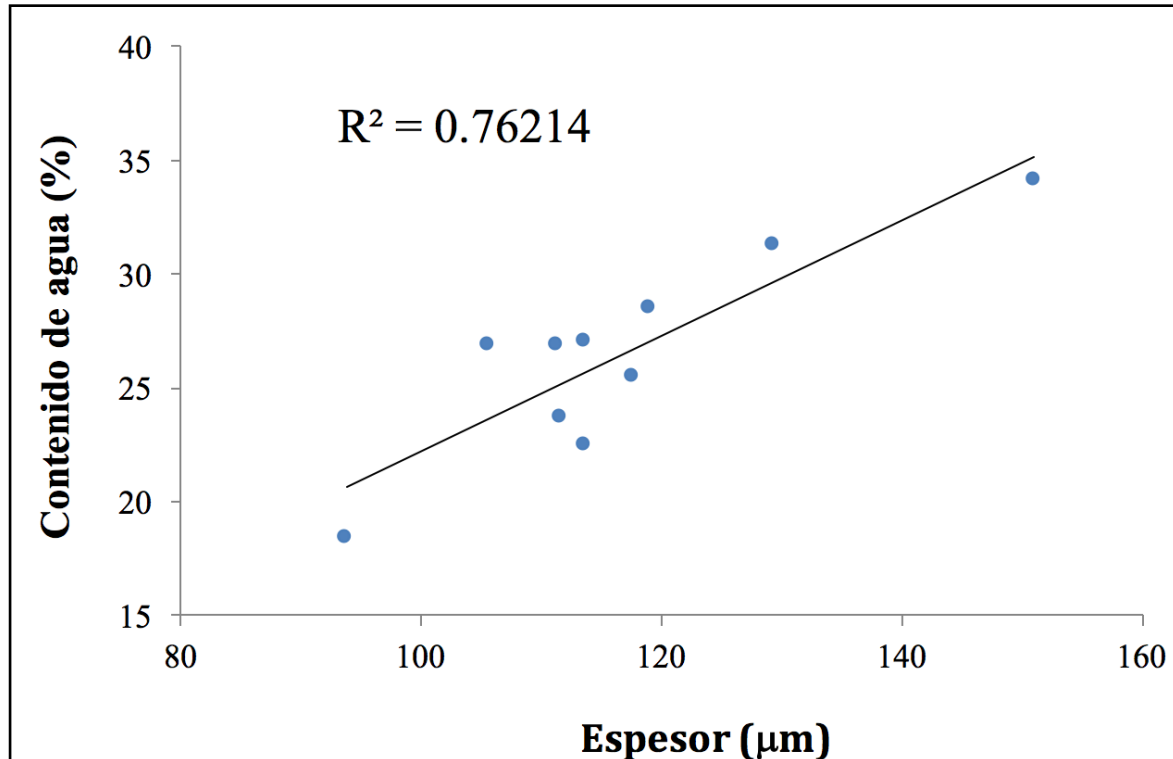


Figura 3-8: Gráfico de la correlación entre el contenido de agua y el espesor de las películas adicionadas con plastificantes.

La triacetina (el plastificante con la menor polaridad) no modifica el espesor de las películas comestibles respecto a la película control (Tabla 3-4). A diferencia de los plastificantes polares, los apolares (baja constante dieléctrica) generan películas con menor número de moléculas de agua. Esto lleva a formar películas comestibles con menor espesor. Con estos antecedentes, se sugiere que la polaridad de las moléculas plastificantes juega un rol determinante en la presencia de moléculas de agua, moléculas que aumentan la plastificación y modifican las propiedades funcionales de las películas.

3.2.3 Permeabilidad al vapor de agua

El rango de los valores de WVP de las películas comestibles fue $1,93 - 5,13 \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, encontrándose dentro del rango de valores descritos para películas fabricadas con biopolímeros (M. A. García, Pinotti, Martino, y Zaritzky, 2009). En particular, Avena-Bustillos et al. (2006) reportan valores de WVP de $2,59 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ para

películas de gelatina de piel de pescado, mientras que Hosseini et al. (2013) reportan valores de películas de quitosano y gelatina plastificadas con glicerol de $6,83 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$. Esto sugiere que la metodología utilizada permite obtener valores de WVP comparables con la literatura.

La Figura 3-9 muestra que las películas comestibles en base a quitosano y gelatina son altamente permeables al vapor de agua. Esta característica sugiere ser resultado de la alta polaridad de los polímeros que forman la película, la cual se traduce en una alta afinidad por las moléculas de agua (Sothornvit y Krochta 2005). Una causa adicional que explica dicho comportamiento es la adición de plastificantes hidrófilos que, por un lado, aumentan los valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y, por otro, ejercen una reducción de las fuerzas de atracción intermoleculares, que provocan un aumento del volumen libre entre las cadenas de polímero, haciendo la matriz de polímero menos densa (Kołodziejaska y Piotrowska 2007). Comparado con la película control (sin plastificantes), la presencia del glicerol provocó un incremento en los valores de WVP (valor- $p < 0,005$); el sorbitol produjo un leve incremento en los valores de WVP (valor- $p < 0,05$), y el PEG400 y la triacetina no cambiaron la WVP de estas películas comestibles (valor- $p > 0,05$).

El glicerol es la molécula de cadena lineal más pequeña y con la más alta constante dieléctrica de las estudiadas (Tabla 2-1), por lo cual absorbe un mayor número de moléculas de agua. Además, el glicerol se mueve fácilmente entre las cadenas de polisacárido-proteína atrayendo más moléculas de agua a la estructura polimérica (Tabla 2-1). Esto implica ejercer un mayor efecto plastificante, pero, también, un aumento de la permeabilidad al vapor de agua (Sothornvit y Krochta 2001). Es posible disminuir el efecto del glicerol sobre el aumento de la WVP, mediante la disminución de su concentración adicionada a las películas (Rivero et al., 2010); sin embargo, podría disminuir su efecto en las propiedades funcionales, tales como las propiedades mecánicas.

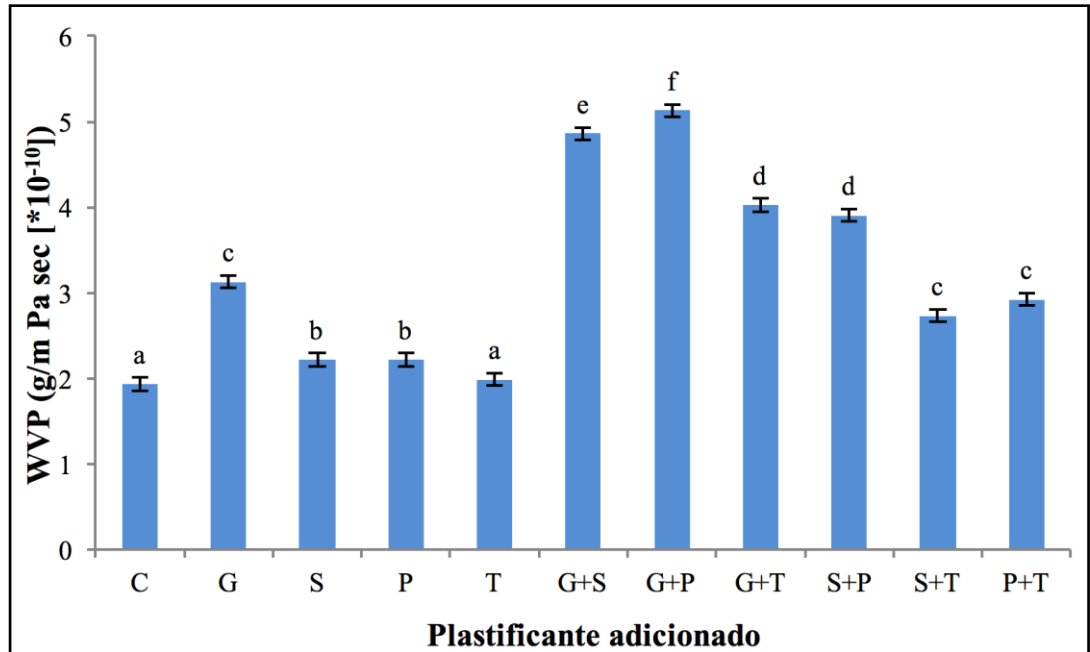


Figura 3-9: Valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas comestibles de gelatina y quitosano sin plastificante (C); película con glicerol (G); película con sorbitol (S); película con PEG400 (P) y película con triacetina (T). El signo “+” significa la adición de dos plastificantes en las películas de gelatina y quitosano. Las letras que figuran en la parte superior de las columnas diferentes significan que los valores presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

La adición de triacetina a las películas comestibles no modificó significativamente los valores de WVP respecto a la película control (Figura 3-9). La triacetina tiene una baja constante dieléctrica, una alta masa molecular y una presencia de doble enlaces en su estructura. Estas características generan que la permeabilidad de películas con triacetina sea similar a la permeabilidad de la película control. Ya que la microestructura de las películas con triacetina está compuesta de cavidades “tipo cráter” (Figura 3-7e), se esperaba que su WVP fuera mayor. Sin embargo, dado que la WVP fue similar al control, es posible concluir que la microestructura de estas películas está compuesta por poros hidrofóbicos no conectados entre ellos, limitando el paso de moléculas de agua.

La WVP de las películas comestibles adicionadas con dos plastificantes fue mayor que la de las películas fabricadas con los correspondientes plastificantes (Figura 3-9). Una de las principales funciones de las películas comestibles es evitar o disminuir la

transferencia de humedad entre el alimento y la atmósfera que lo rodea, por lo cual la WVP debería ser lo más bajo posible (Gontard y Guilbert 1994). Dado que las películas adicionadas con un plastificante poseen valores de WVP menores que las películas con dos plastificantes, es posible sugerir que las películas adicionadas con un plastificante presentan un mejor comportamiento de barrera al vapor de agua que las películas con dos plastificantes, considerando que todas las películas contenían la misma concentración total de plastificantes. Por ello, este hallazgo sugiere que los plastificantes modulan la permeabilidad al vapor de agua de las películas de gelatina y quitosano mediante mecanismos diferentes y sinérgicos.

3.2.4 Propiedades mecánicas

La película control (sin la adición de plastificantes) posee altos valores de resistencia a la tracción (TS) y módulo elástico (EM) ($19,2 \pm 3,1$ MPa y 2192 ± 121 MPa, respectivamente) y bajo porcentaje de elongación ($1,2 \pm 0,3\%$) (Tabla 3-5). Estos valores son típicos de materiales quebradizos y rígidos, debido a la alta interacción entre las moléculas que forman la película (Cao et al., 2009; Rivero et al., 2010). Dado que los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares, interaccionando entre las cadenas poliméricas (Sothornvit y Krochta, 2005), se demuestra la necesidad de adicionar plastificantes a las películas de gelatina y quitosano para mejorar sus propiedades mecánicas.

Tabla 3-5: Valores de resistencia a la tracción, porcentaje de elongación y módulo elástico de las películas comestibles de gelatina y quitosano con plastificantes.

	Resistencia a la tracción (RT)	Porcentaje elongación (%E)	Módulo elástico (ME)
	(MPa)	(%)	(MPa)
C	19,2 ^e	1,2 ^a	2192 ^d
G	6,4 ^a	86,8 ^f	2,9 ^a
S	10,9 ^b	67,5 ^{cd}	30,3 ^a
P	24,7 ^f	53,3 ^b	304,4 ^b
T	17,2 ^{de}	1,3 ^a	1582 ^c
G + S	5,8 ^a	74,8 ^{de}	6,2 ^a
G + P	10,3 ^b	72,8 ^{de}	9,0 ^a
G + T	12,9 ^{bc}	80,0 ^{ef}	4,1 ^a
S + P	14,8 ^{cd}	64,3 ^c	38,2 ^a
S + T	14,8 ^{cd}	62,1 ^c	44,9 ^a
P + T	25,9 ^f	61,6 ^c	21,6 ^a

Las letras diferentes que figuran en la parte superior de los valores de RT, %E y ME significan que los valores presentan diferencias significativas ($p < 0,05$). Película sin plastificante (Control); película con glicerol (G); película con sorbitol (S); película con PEG400 (P) y película con triacetina (T). El signo “+” significa la adición de dos plastificantes en las películas de gelatina y quitosano.

Generalmente, la incorporación de plastificantes en las películas de proteínas y polisacáridos se asocia con la reducción de la TS, como resultado de la reducción de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas (Matet et al., 2013; Sothornvit y Krochta, 2005). Acorde con esto, la adición del glicerol y el sorbitol a las películas comestibles estudiadas cambió significativamente los valores de TS, %E y EM, respecto a la película control (Tabla 3-5). Específicamente, la TS de las películas con glicerol y sorbitol disminuyó un 67,7% y 43,2% respectivamente, en comparación con la película control. Sin embargo, la adición de PEG400 en las películas incrementó significativamente la TS un 28,6% respecto a la película control. Un incremento en la resistencia a la tracción en películas de gelatina con la adición de PEG400 se atribuye

a la fuerte interacción que se produce en la red polimérica que compone las películas de proteínas (Jongjareonrak, Benjakul, Visessanguan, y Tanaka, 2006). Esta fuerte interacción en la red polimérica se corrobora por los altos valores de variabilidad en la abundancia total obtenidos en los experimentos de las imágenes químicas (Tabla 3-5) y por las diferencias respecto a la película control de las abundancias de gelatina y quitosano. Con estos antecedentes es posible clasificar a PEG400 como un plastificante interno. Este resultado difiere de lo sugerido por Domján et al. (2009), quienes mencionan que PEG400 es una molécula móvil en películas de quitosano. Cabe mencionar que dichas películas no contenían gelatina, lo cual podría estar favoreciendo la interacción de PEG400 con glicerol mediante la formación de interacciones entre gelatina, quitosano y PEG400.

Los plastificantes que modificaron mayormente el módulo elástico respecto a la película control fueron el glicerol y el sorbitol. En particular, el glicerol redujo la rigidez de las películas diez veces más que el sorbitol. El menor tamaño molecular del glicerol permite que sea insertado con mayor facilidad entre las cadenas de los polímeros y, por consiguiente, ejerza mayor influencia mecánica (Bourtoom, 2008). La Figura 3-3 muestra que la abundancia de la gelatina y el quitosano no varía (respecto a la película control) en presencia de sorbitol; en cambio, la abundancia del quitosano disminuye en películas con glicerol. Estos antecedentes demuestran que el glicerol presenta un mecanismo de plastificación interno y el sorbitol, un mecanismo externo. Esto, pese a que algunos autores han sugerido que el mecanismo de ambos plastificantes es interno (Real et al., 2013).

El pronunciado efecto que ejercen el glicerol y el sorbitol en las propiedades mecánicas de las películas comestibles fue también observado cuando los plastificantes fueron adicionados en mezclas de dos compuestos (Tabla 3-7). En este caso, los valores de resistencia a la tracción fueron reducidos en hasta un 70% respecto a la película control. De este mismo modo, las películas adicionadas con glicerol y sorbitol mostraron grandes diferencias en los valores de %E y el EM cuando se compararon con las películas control.

Las películas comestibles adicionadas con triacetina mostraron propiedades mecánicas similares a las películas sin plastificantes, indicando que la triacetina no tuvo un efecto plastificador relevante en las películas (Tabla 3-5). La resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación no tuvieron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, el módulo elástico de las películas con la triacetina (1582 ± 121 MPa) disminuyó significativamente respecto a la película control (2192 ± 205 MPa) (valor- $p < 0,05$), indicando que la triacetina disminuye la rigidez.

A partir de los datos obtenidos mediante NIR-CI, se determinó que las películas adicionadas con la triacetina presentaron los menores valores de variabilidad (Tabla 3-3), sus valores de curtosis de la gelatina y el quitosano fueron los más cercanos a cero (Figura 3-2e) y la abundancia de la gelatina aumentó respecto a la película control. Junto con esto, se obtuvieron películas con una microestructura distinta a la de la película control (Figura 3-7e).

3.3 Correlación entre las variables obtenidas por NIR-CI y propiedades mecánicas.

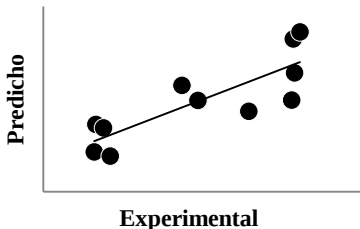
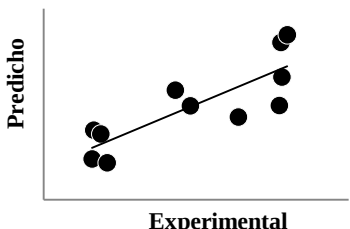
La variabilidad de la abundancia de la gelatina y la del quitosano fueron los parámetros que presentaron la mayor correlación con la resistencia a la tracción de las películas (Tablas 3-6 y 3-7). El modelo de regresión lineal múltiple (MLR) empleado para estudiar la correlación entre estas variables arrojó un coeficiente de correlación (R^2) de 0,69 y un valor- p de 0,009. Esta correlación podría originarse por las fuertes interacciones entre ambos polímeros (Benbettaïeb et al., 2014). Teniendo en cuenta que la variabilidad de abundancia estima el grado de la distribución de los componentes de las películas (Puchert et al., 2010) y que el grado de distribución es obtenido por la habilidad de los componentes para formar interacciones moleculares que gobiernan la estructura tridimensional de las películas comestibles (Skurtys et al., 2010), es posible sugerir que la variabilidad de abundancia de los componentes de las películas sí está relacionada con la resistencia a la tracción de las películas comestibles.

Los modelos de MLR mostraron que las variables que incluyeron la abundancia de quitosano y su variabilidad presentaron el menor valor- p (Tabla 3-6 y 3-7). Esto indica que la presencia del quitosano es un factor importante en la modulación de la

resistencia a la tracción de estas películas. Esto se puede explicar porque el glicerol, un compuesto que interactúa principalmente con el quitosano, modifica significativamente las propiedades mecánicas de las películas. Sin embargo, la triacetina, que interactúa principalmente con la gelatina, modifica levemente sus propiedades mecánicas. Esto sugiere que la película comestible está compuesta por una red polimérica de gelatina que define la conformación estructural de la película, mientras que el quitosano juega un rol de anclaje. Este rol permite que el quitosano interactúe con los plastificantes polares, reduciendo la rigidez y la fragilidad de la película, como es sugerido por otros autores (Hosseini et al., 2013; Jridi et al., 2014; Liu et al., 2012).

La variabilidad de la abundancia de la gelatina mostró una correlación positiva con la resistencia a la tracción, mientras que la variabilidad de la abundancia del quitosano tuvo una correlación inversa (Tabla 3-6). El incremento de la distribución del quitosano sugiere que este aumenta el entrecruzamiento de la gelatina y disminuye la cantidad de puentes de hidrógeno en las películas (Hosseini et al., 2013), lo que origina un debilitamiento de las interacciones entre los polímeros y una disminución en la distribución de la gelatina. Por lo tanto, la reducción de la distribución de la gelatina podría ser el factor responsable del aumento de la resistencia a la tracción de las películas. Esto refuerza la evidencia de que el quitosano juega un rol de anclaje y que la estructura de la película estaría formada por una red polimérica de gelatina.

Tabla 3-6: Correlación de la resistencia a la tracción con la desviación estándar de la abundancia de los componentes de las películas.

	Resistencia a la tracción v/s				Resistencia a la tracción v/s		
	[STD _(Ge) , STD _(Q) ,		STD _{(Plas)]⁽¹⁾}		[STD _(Ge) , STD _{(Q)]⁽²⁾}		
Gráfico							
R ²	0,692				0.691		
Valor-p del modelo	0,033				0.009		
Valor-p de la variable	0,010	0,007	0,884		0.005	0.003	
Coefficientes del modelo ⁽¹⁾	D = 21,2	a = 11,6	b = -13,1	c = 0,2	D = 21,0	a = 11,6	b = -12,9

⁽¹⁾ $y = D + a$

$STD_{(Ge)} + b STD_{(Ch)} + c STD_{(Plas)}$; ⁽²⁾ $y = D + a STD_{(Ge)} + b STD_{(Ch)}$.

$STD_{(Ge)}$ corresponde a la variabilidad de la abundancia de gelatina; $STD_{(Q)}$ corresponde a la variabilidad de la abundancia de quitosano y $STD_{(plas)}$ corresponde a la variabilidad de la abundancia de los plastificantes.

Ge, Q y Plas corresponden a gelatina, quitosano y plastificante, respectivamente.

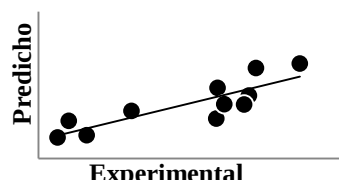
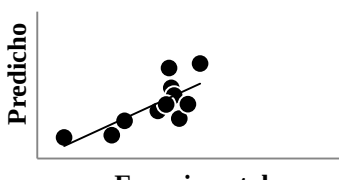
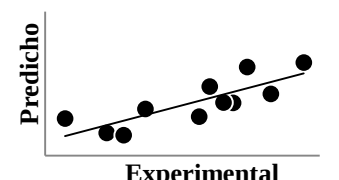
	Resistencia a la tracción v/s				Resistencia a la tracción v/s			Resistencia a la tracción v/s		
	[A _(Ge) , A _(Q) , A _{(Plas)]⁽¹⁾}				[A _(Ge) , A _{(Q)]⁽²⁾}			[A _(Q) , A _{(Plas)]⁽³⁾}		
Gráfico										
R ²	0,718				0,568			0,669		
Valor-p del modelo	0,02				0,03			0,01		
Valor-p de la variable	0,3	0,005	0,09		0,09	0,01		0,004	0,03	
Coeficientes del modelo ⁽¹⁾	D = 10,8	a = 0,3	b = 1,2	c = - 0,7	D = -40,1	a = 0,6	b = 1,1	D = -17,7	a = 1,0	b = - 0,9

Tabla 3-7: Correlación de la resistencia a la tracción con la abundancia de los componentes de las películas comestibles.

⁽¹⁾ $y = D + a A_{(Ge)} + b A_{(Ch)} + c A_{(Plas)}$; ⁽²⁾ $y = D + a A_{(Ge)} + b A_{(Ch)}$; ⁽³⁾ $y = D + a A_{(Ch)} + b A_{(Plas)}$.

A_(Ge) corresponde a la abundancia de gelatina; A_(Q) corresponde a la abundancia de quitosano y A_(plas) corresponde a la abundancia de los plastificantes.

Ge, Q y Plas corresponden a gelatina, quitosano y plastificante, respectivamente.

El porcentaje de elongación (%E) y el módulo elástico (EM) no presentaron correlación significativa ni con los valores de abundancia ni con los de variabilidad. Una posible explicación a esto es que las propiedades mecánicas de %E y EM son métricas que describen la relajación de la red polimérica de las películas comestibles, relajación que puede ser modificada por la adición de plastificantes (Sothornvit y Krochta, 2005). Por lo tanto, el comportamiento mecánico de las películas sin plastificantes o con comportamiento similar al de la película control (i.e., con triacetina) difirió significativamente del comportamiento mecánico de las películas plastificadas. Por ejemplo, el EM de la película control y el de la película con triacetina fueron tres órdenes de magnitud mayor que el EM de la película con glicerol. Esto muestra que los parámetros obtenidos por NIR-CI están relacionados con la resistencia de las películas comestibles, pero no con la rigidez ni con la elasticidad.

4. CONCLUSIONES

Este estudio es el primer reporte del uso de imágenes químicas mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR-CI) para estudiar películas comestibles de quitosano y gelatina, con el propósito de caracterizar sus propiedades mecánicas y mejorar su fabricación.

El análisis de NIR-CI reveló que la abundancia de la gelatina y del quitosano varía en función del plastificante adicionado. El estudio de las propiedades mecánicas y el análisis de NIR-CI permitieron sugerir que los polímeros formadores presentan mayor interacción con determinados plastificantes. En concreto, se sugirió que el quitosano interactúa principalmente con el glicerol, mientras que la gelatina interactúa principalmente con la triacetina.

A pesar de que las películas comestibles mostraron una distribución uniforme de sus componentes, la distribución de la gelatina y el quitosano cambió en respuesta al plastificante adicionado. En particular, el PEG400 es el plastificante que modificó mayormente la distribución de la gelatina y el quitosano cuando se comparó con la película control, mientras que la triacetina es el plastificante que menos impacto generó en la distribución de los polímeros.

La polaridad de los plastificantes (definida por su constante dieléctrica) demostró ser el factor más importante que gobierna las propiedades de las películas comestibles de la gelatina y el quitosano, tales como la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades mecánicas y el espesor. Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier sugirieron que los plastificantes más polares (glicerol y sorbitol) interactúan con las películas a través de puentes de hidrógeno. En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se observó que las películas más homogéneas y con superficies lisas fueron las películas adicionadas con glicerol y sorbitol, comprobando la relajación que provocan en la estructura. Esto se debe a que el quitosano interactúa principalmente con los compuestos polares (glicerol y sorbitol), que afectan las propiedades mecánicas de las películas y relajan su estructura tridimensional.

Los resultados, en su conjunto, sugieren que la conformación estructural de la película comestible consiste en una red polimérica formada por gelatina, mientras que el quitosano

cumple un rol de anclaje, interaccionando con los plastificantes para disminuir la rigidez y la fragilidad de la película. La variabilidad de la abundancia de la gelatina y la del quitosano presentan una correlación estadísticamente significativa con la resistencia a la tracción de las películas comestibles, sugiriendo que es posible determinar la resistencia mecánica de las películas mediante un análisis rápido y no invasivo.

Aumentar la funcionalidad de las películas comestibles es un desafío actual. La adición de extractos naturales, ya sean libres o encapsulados, es una manera de lograrlo. Determinar el efecto de la adición de agentes funcionales en las propiedades funcionales de las películas es un tema que aún requiere ser investigado.

5. REFERENCIAS

- Alcalà-Bernàrdez, M. (2006). *Utilización de la Espectroscopia NIR en el Control Analítico de la Industria Farmacéutica*. Univerisdad Autònoma de Barcelona. Tesis Doctoral.
- Alexandrino, G. L., y Poppi, R. J. (2013). NIR imaging spectroscopy for quantification of constituents in polymers thin films loaded with paracetamol. *Anal Chim Acta*, 765, 37–44.
- Amigo, J. M., Cruz, J., Bautista, M., MasPOCH, S., Coello, J., y Blanco, M. (2008). Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(8), 696–713.
- Arvanitoyannis, I. S., Nakayama, A., y Aiba, S. (1998). Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37(4), 371–382.
- ASTM. (2010). E96M-10, Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In *Annual Book of ASTM*. West Conshohocken, PA.
- ASTM. (2012). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting D882-12. In *Annual Book of ASTM*. Philadelphia, PA.
- Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., y McHugh, T. H. (2006). Water Vapor Permeability of Mammalian and Fish Gelatin Films. *Journal of Food Science*, 71(4), E202–E207.
- Baldwin E.A., Níspero-Carriedo M.O., y Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortSci*, 30, 35–40.

- Bedoui, F., Widjaja, L. K., Luk, A., Bolikal, D., Murthy, N. S., y Kohn, J. (2012). Anomalous increase in modulus upon hydration in random copolymers with hydrophobic segments and hydrophilic blocks. *Soft Matter*, 8(7), 2230.
- Benbettaieb, N., Kurek, M., Bornaz, S., y Debeaufort, F. (2014). Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin-chitosan blend films related to biopolymer interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2409–2419.
- Bergo, P., y Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1285–1289.
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M., y Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3),
- Boada-Lopez, J., DeJesus-Maldonado, I., Jerez, J., Romañach, R., Difffoot-Carlo, N., y Sundaram, P. (2013). Collagen abundance in mechanically stimulated osteoblast cultures using near infrared microscopy. *Journal of Biomechanics*, 46(14), 2442–2450.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
- Bozdemir, O. A., y Tutas, M. (2003). Plasticiser effect on water vapour permeability properties of locust bean gum-based edible films. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(6), 773–782.
- Cao, N., Yang, X. M., y Fu, Y. H. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729–735.
- Cervera, M., Heinämäki, J., de la Paz, N., López, O., Maunu, S., Virtanen, T., ... Yliruusi, J. (2011). Effects of Spray Drying on Physicochemical Properties of Chitosan Acid Salts. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 637–649.
- Chen, D., Hu, B., Shao, X., y Su, Q. (2004). Removal of major interference sources in aqueous near-infrared spectroscopy techniques. *Anal Bioanal Chem*, 379(1), 143–148.
- Chiou, B.-S., Avena-Bustillos, R. J., Bechtel, P. J., Imam, S. H., Glenn, G. M., y Orts, W. J. (2009). Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering*, 95(2), 327–331.
- Coates, J. P. (2010). Infrared Spectroscopy for Process Analytical Applications. In *Process Analytical Technology* (pp. 157–194). Chichester, UK: John Wiley y Sons, Ltd.
- Cuq, B., Gontard, N., y Guilbert, S. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75(1), 1–9.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., y Qi, P. (2009). Structure and Function of Protein-Based

- Edible Films and Coatings. In *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 25–56). New York, NY: Springer New York.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., y Voilley, A. (1998). Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299–313.
- Debeaufort, F., y Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. In C. K. Huber y E. M. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 135–168). New York, NY: Springer New York.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435–450.
- Domján, A., Bajdik, J., y Pintye-Hódi, K. (2009). Understanding of the Plasticizing Effects of Glycerol and PEG 400 on Chitosan Films Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Macromolecules*, 42(13), 4667–4673.
- Ellison, C. D., Ennis, B. J., Hamad, M. L., y Lyon, R. C. (2008). Measuring the distribution of density and tableting force in pharmaceutical tablets by chemical imaging. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(1), 1–7.
- Elsabee, M. Z., y Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33(4), 1819–1841.
- Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., Du, W.-X., Chiou, B.-S., Williams, T. G., Wood, D., ... Soares, N. F. F. (2014). Physical and Antibacterial Properties of Açaí Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols. *Journal of Food Science*, 79(5), 903–910.
- Fakhreddin Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M., y Ghavi, F. F. (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490–1495.
- Fringant, C., Rinaudo, M., Foray, M. F., y Bardet, M. (1998). Preparation of mixed esters of starch or use of an external plasticizer: two different ways to change the properties of starch acetate films. *Carbohydrate Polymers*, 35(1-2), 97–106.
- Furukawa, T., Sato, H., Shinzawa, H., Noda, I., y Ochiai, S. (2007). Evaluation of homogeneity of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(L-lactic acid) studied by near infrared chemical imaging (NIRCI). *Anal Sci*, 23(7), 871–876.
- Galdeano, M. C., Wilhelm, A. E., Mali, S., y Grossmann, M. V. E. (2013). Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., y Zaritzky, N. E. (2009). Characterization of

- Starch and Composite Edible Films and Coatings. In *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 169–209). New York, NY: Springer New York.
- García, M., Pinotti, A., Martino, M., y Zaritzky, N. (2009). Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. In K. C. Huber y M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 169–209). Springer New York.
- Gendrin, C., Roggo, Y., y Collet, C. (2008). Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J Pharm Biomed Anal*, 48(3), 533–553.
- Gennadios, A., Weller, C. L., y Gooding, C. H. (1994). Measurement Errors in Water-Vapor Permeability of Highly Permeable, Hydrophilic Edible Films. *Journal of Food Engineering*, 21(4), 395–409.
- Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A. R., Rezayi, K., Razmi Rad, E., y Milani, J. (2007). Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1191–1197.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., Fernández-Martín, F., y Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatine-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1461–1469.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., y Gómez-Guillén, M. C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105(2), 511–520.
- Gontard, N., y Guilbert, S. (1994). Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In M. Mathlouthi (Ed.), *Food Packaging and Preservation SE - 9* (pp. 159–181). Springer US.
- Gorris, L., y Arvanitoyannis, I. (1999). Edible and biodegradable polymeric materials for food packaging or coating. In *Processing Foods*. CRC Press.
- Guilbert, S. (1986). *Food packaging and preservation. Technology and application of edible protective films*. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Guilbert, S., Gontard, N., y Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29(1-2), 10–17.
- Hosseini, S. F. ., Rezaei, M. ., Zandi, M. ., y Ghavi, F. F. . (2013). Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490–1495.
- Immergut, E. H., y Mark, H. F. (1965). Principles of plasticization. In R. F. Gould (Ed.),

- Plasticization and Plasticizer Processes* (pp. 1–26). Washington, DC: American Chemical Society.
- Jérez Rozo, J. I., Zarow, A., Zhou, B., Pinal, R., Iqbal, Z., y Romañach, R. J. (2011). Complementary Near-Infrared and Raman Chemical Imaging of Pharmaceutical Thin Films. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 4888–4895.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., y Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 585–593.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 229–235.
- Jridi, M., Hajji, S., Ayed, H. Ben, Lassoued, I., Mbarek, A., Kammoun, M., ... Nasri, M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin–chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67(0), 373–379.
- Juan, A. de, Tauler, R., Dyson, R., Marcolli, C., Rault, M., y Maeder, M. (2004). Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(1), 70–79.
- Kasaai, M. (2010). The Use of Various Types of NMR and IR Spectroscopy for Structural Characterization of Chitin and Chitosan. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives* (pp. 149–170). CRC Press.
- Kester O. R., J. J. and F. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40(12), 47–59.
- Khorasani, M., Amigo, J. M., Sun, C. C., Bertelsen, P., y Rantanen, J. (2015). Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) as a process monitoring solution for a production line of roll compaction and tableting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 293–302.
- Kołodziejaska, I., y Piotrowska, B. (2007). The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, 103(2), 295–300.
- Krochta, J. M., Baldwin, E. A., y Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster, Pa.: Technomic Publ. Co.

- Kurusu, R. S., Siliki, C. A., David, É., Demarquette, N. R., Gauthier, C., y Chenal, J.-M. (2015). Incorporation of plasticizers in sugarcane-based poly(3-hydroxybutyrate) (PHB): Changes in microstructure and properties through ageing and annealing. *Industrial Crops and Products*, 72, 166–174.
- Lefèvre, T., y Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform infrared spectroscopy: model studies on β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 365–376.
- Lewis, E. N., y Kidder, L. H. (2010). Technologies and Practical Considerations for Implementing Near-Infrared Chemical Imaging. In *Raman, Infrared, and Near-Infrared Chemical Imaging* (pp. 75–91). John Wiley y Sons, Inc.
- Lewis, E. N., Schoppelrei, J. W., Lee, E., y Kidder, L. H. (2007). Near-Infrared Chemical Imaging as a Process Analytical Tool. In *Process Analytical Technology* (pp. 187–225). Blackwell Publishing Ltd.
- Liu, Z. Y., Ge, X. J., Lu, Y., Dong, S. Y., Zhao, Y. H., y Zeng, M. Y. (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 311–317.
- Martínez-Camacho, a. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, a. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., ... Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305–315.
- Matet, M., Heuzey, M. C., Pollet, E., Ajji, A., y Averous, L. (2013). Innovative thermoplastic chitosan obtained by thermo-mechanical mixing with polyol plasticizers. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 241–251.
- McHugh, T. H., Aujard, J. F., y Krochta, J. M. (1994). Plasticized Whey Protein Edible Films: Water Vapor Permeability Properties. *Journal of Food Science*, 59(2), 416–419.
- McHugh, T. H., Avenabustillos, R., y Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic Edible Films - Modified Procedure for Water-Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Mitchell, J. R. (1986). Water and Food Macromolecules. In S. E. Hill, D. A. Ledward, y J. R. Mitchell (Eds.), *Functional Properties of Food Macromolecules* (Vol. 38, pp. 50 – 76). Maryland, Aspen.
- Nieto, M. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In K. C. Huber y M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 57–112). Springer New York.

- Palou, A., Cruz, J., Blanco, M., Tomàs, J., de los Ríos, J., y Alcalà, M. (2012). Determination of drug, excipients and coating distribution in pharmaceutical tablets using NIR-CI. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(2), 90–97.
- Pan, H., Jiang, B., Chen, J., y Jin, Z. (2014). Blend-modification of soy protein/lauric acid edible films using polysaccharides. *Food Chemistry*, 151(0), 1–6.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., y Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1372–1381.
- Puchert, T., Lochmann, D., Menezes, J. C., y Reich, G. (2010). Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) for counterfeit drug identification—A four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature). *J Pharm Biomed Anal*, 51(1), 138–145.
- Rahman, M. S., Ai-Saidi, G. S., y Guizani, N. (2008). Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chemistry*, 108(2), 472–481.
- Rangel-Marrón, M., Montalvo-Paquini, C., Palou, E., y López-Malo, A. (2013). Optimization of the moisture content, thickness, water solubility and water vapor permeability of sodium alginate edible films. In J. A. Duarte, M. Kibler, y R. Hefferlin (Eds.), *Recent Advances in Chemical Engineering, Biochemistry and Computational Chemistry* (pp. 72 – 78). Paris, France: WSEAS Press.
- Rathke, T. D., y Hudson, S. M. (1993). Determination of the degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(3), 749–753.
- Real, D. A., Martinez, M. V, Frattini, A., Soazo, M., Luque, A. G., Biasoli, M. S., ... Leonardi, D. (2013). Design, Characterization, and In Vitro Evaluation of Antifungal Polymeric Films. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 64–73.
- Rivero, S., García, M. a., y Pinotti, a. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 531–539.
- Rivero, S., García, M. A., y Pinotti, A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 11(2), 369–375.
- Rogers, C. E. (1985). Permeation of Gases and Vapours in Polymers. In *Polymer Permeability* (pp. 11–73). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Sacré, P. Y., De Bleye, C., Chavez, P. F., Netchacovitch, L., Hubert, P., y Ziemons, E.

- (2014). Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications. *J Pharm Biomed Anal*, (0).
- Segtnan, V. H., y Isaksson, T. (2004). Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 18(1), 1–11.
- Senichev, V. Y., y Tereshatov, V. V. (2012). Theories of compatibility. In G. B. T.-H. of P. (Second E. Wypych (Ed.), *Handbook of Plasticizers* (pp. 135–164). Boston: Elsevier.
- Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., y Aguilera, J. M. (2010). Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings. In C. Hollingworth (Ed.), *Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures* (pp. 41–80). Nova Publishers.
- Sothornvit, R., y Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50(3), 149–155.
- Sothornvit, R., y Krochta, J. M. (2005). Plasticizers in edible films and coating. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (pp. 403–428). Canada: Elsevier.
- Susarla, R., Sievens-Figueroa, L., Bhakay, A., Shen, Y., Jerez-Rozo, J. I., Engen, W., ... Davé, R. N. (2013). Fast drying of biocompatible polymer films loaded with poorly water-soluble drug nano-particles via low temperature forced convection. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1–2), 93–103.
- van den Broek, L. A. M., Knoop, R. J. I., Kappen, F. H. J., y Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 116(0), 237–242. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.039>
- Videki, B., Klebert, S., y Pukanszky, B. (2007). External and internal plasticization of cellulose acetate with caprolactone: Structure and properties. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 45(8), 873–883.
- Wang, A. N., Wu, L. G., Li, X. L., Sun, Y. D., Wang, J., Wang, S. W., ... Xu, X. Y. (2011). Study on the Blend Film Prepared by Chitosan and Gelatin. *Advanced Materials Research*, 201-203, 2866–2869.
- Wang, J., Sowa, M. G., Ahmed, M. K., y Mantsch, H. H. (1994). Photoacoustic Near-Infrared Investigation of Homo-Polypeptides. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(17), 4748–4755.
- Wang, Y., Wu, Z., Wang, Z., Xu, M., Shi, X., y Qiao, Y. (2016). Rapid analysis of spatial distribution of PVPP and hardness of Yinhuang dispersible tablets by NIR-CI. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 09(02), 1550016.
- Wittaya, T. (2013). Influence of Type and Concentration of Plasticizers on the Properties of

Edible Film From Mung Bean Proteins. *KMITL Science and Technology Journal*, 13(1), 51–58.

Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., y Nag, D. (2005). Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21(2), 185–192.

Zapf, C. (2009). Application of Infrared Analysis to Edible Films. In K. C. Huber y M. E. Embuscado (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 335–346). Springer New York.

Zhu, J., Li, X., Huang, C., Chen, L., y Li, L. (2013). Plasticization effect of triacetin on structure and properties of starch ester film. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 874–881.