

Artículo recibido 2 de agosto de 2023

Publicado 25 de septiembre de 2023

Películas comestibles a base de proteína de suero de quesería activadas con miel y antimicrobianos

Osuna, Mariana B. ^{a,b,c}; Freiner, Noelia V. ^a; Romero, Cecilia A. ^a; Bertola, Nora C. ^{c,d}^a Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus), Chaco, Argentinamariano@uncaus.edu.ar; noefreitner.111@gmail.com; ceciliaromero@uncaus.edu.ar^b Instituto de Investigaciones en Procesos Tecnológicos Avanzados (INIPTA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – UNCAus, Chaco, Argentina.mariano@uncaus.edu.ar^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina. mariano@uncaus.edu.ar; bertolanora@gmail.com^d Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) - CONICET, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Buenos Aires, Argentina. bertolanora@gmail.com

ORCID Nora Bertola 0000-0003-3603-6905

ORCID Cecilia Romero 0000-0001-8437-7363

ORCID Mariana Osuna 0000-0001-5133-392X

ORCID Noelia Freitner 0009-0000-9837-4083

Resumen

Se evaluó la influencia de la adición de miel de *Apis mellifera* y sorbato de potasio (SK) sobre las propiedades mecánicas, de barrera y ópticas de películas comestibles simples o compuestas activas a base de proteína aislada de suero de quesería (WPI) y/o pectina. Para ello, se prepararon películas simples (PS) de WPI y películas compuestas (PC) de WPI+pectina, utilizando como plastificantes: glicerol, miel o combinación de ambos y se adicionó como antimicrobiano SK. En comparación con las PS con glicerol, la miel

produjo películas más elásticas, menos rígidas, menos permeables al vapor de agua y con mayor barrera a la luz UV (BUV). Por otro lado, el SK produjo PC menos permeables al vapor de agua y, PS y PC con miel menos rígida. Por lo que, los resultados indican que la miel y el SK tienen potencial como plastificante en películas. Además, las películas con miel y SK presentaron la mejor BUV. En conclusión, estas podrían ser utilizadas como nuevos biomateriales activos para la protección de alimentos.

Palabras clave: biomateriales, plastificantes, sorbato de potasio.

Abstract

Whey protein-based edible films activated with honey and antimicrobials

In this study, the influence of the addition of *Apis mellifera* honey and potassium sorbate (SK) on the mechanical, barrier and optical properties of edible active simple or compound films based on whey protein isolate (WPI) and/or pectin was evaluated. For this, simple films (PS) of WPI and composite films (PC) of WPI+pectin were prepared, using glycerol, honey or a combination of both as plasticizers and SK as an antimicrobial. When compared to glycerol-plasticised PS, honey produced films that are more elastic, less rigid, less permeable to water vapour, and with a higher barrier to UV light (BUV). On the other hand, SK produced less permeable PC to water vapour and less rigid PS and PC with honey. Therefore, the results indicate that honey and SK have great potential as a plasticizer in films. In addition, films with honey and SK presented the best BUV. In conclusion, these films could be used as new active biomaterials for food protection.

Keywords: biomaterials, plasticizers, potassium sorbate.

INTRODUCCIÓN

La creciente contaminación ambiental debido a la dificultad en el reciclado del material de embalaje sintético ha alentado a los investigadores hacia el desarrollo de películas biodegradables. Muchos polisacáridos y proteínas tienen buenas propiedades de formación de película y se utilizan con frecuencia para su formulación [1]. Mediante la adición de sustancias funcionales y bioactivas en la matriz, las películas/recubrimientos comestibles pueden transformarse en sistemas activos [2]. Según Hassan y col. [3] este método ha surgido como un sustituto respetuoso con el medio ambiente de los recubrimientos no comestibles tradicionales. La proteína de suero de leche aislada (WPI) es un polímero versátil que produce una película que es insípida, transparente, flexible, impermeable a los compuestos hidrófobos, termosellable y una buena barrera al oxígeno [4, 5]. Sin embargo, una alta permeabilidad al vapor de agua y la baja resistencia a la tracción se consideran como desventajas de las películas de WPI. Las pectinas pueden ser extraídas de la cáscara de los cítricos u orujo de manzana, que son residuos de la industria elaboradora de jugos. Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, comestibilidad y a sus propiedades, la pectina es adecuada para la elaboración de películas comestibles que permiten el desarrollo de envases activos para alimentos [6]. Las mezclas de proteínas y polisacáridos pueden dar como resultado complejos proteína-polisacárido que formarán películas con propiedades físicas ventajosas. Las mezclas de proteínas y polisacáridos en la solución dan como resultado una separación de fases que puede ser asociativa (atracción entre polímeros) o segregativa (repulsión entre polímeros). Durante la separación asociativa, los biopolímeros de cargas opuestas pueden reticularse mediante interacción electrostática y formar una fase rica en biopolímeros (coacervado) y la otra en disolvente. Esta separación también se conoce como coacervación compleja y se puede aplicar para preparar películas comestibles compuestas, con el objetivo de mejorar las propiedades funcionales de las mismas [7]. Las películas biodegradables necesitan un agente plastificante para evitar que se vuelvan quebradizas debido a las fuertes interacciones intermoleculares ya que el plastificante reduce los enlaces intermoleculares entre las cadenas de polímeros, modifican las propiedades mecánicas y producen películas más flexibles[6].

La miel de *Apis mellifera* es una solución concentrada de una mezcla compleja de azúcares de los cuales la fructosa y la glucosa son los principales contribuyentes [8]. Hasta la fecha, existen pocos trabajos utilizando la miel de *Apis mellifera* como un plastificante en películas. Soininen, Heinämäki y Yliruusi [9] estudiaron los efectos de la miel de acacia sobre las películas de WPI sobre las propiedades mecánicas y de barrera a la humedad, encontrándose que la miel de acacia es aplicable en las películas de WPI.

Osuna y col. [8] analizaron el efecto plastificante de la miel de *Apis mellifera* sobre las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y ópticas de las películas de WPI en comparación con el glicerol. Una forma de reducir la cantidad de conservantes adicionados en alimentos es utilizar los recubrimientos comestibles como soportes activos, los cuales proveen por difusión una concentración eficaz de dichos agentes en la superficie del alimento inhibiendo el desarrollo de microorganismos contaminantes. Si bien resulta beneficiosa la incorporación de distintos aditivos en la formulación de los recubrimientos y películas, debe tenerse en cuenta que estos pueden afectar sus propiedades mecánicas y de barrera. Por lo tanto, **se plantea, evaluar la influencia de la adición de miel de *Apis mellifera* y sorbato de potasio (antimicrobiano) sobre las propiedades mecánicas, de barrera y ópticas de películas comestibles activas simples o compuestas a base de proteína aislada de suero de quesería y/o pectina.**

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Materiales

El aislado de proteína de suero de queso (WPI) fue proporcionado por Arla Foods Ingredients S.A. (Arla Foods Ingredients, Córdoba, Argentina). La pectina con alto contenido de metoxilo (Andre tipo APA103), extraída de orujo de manzana, fue suministrada por Grupo Saporiti S.A (Buenos Aires, Argentina). La miel de *Apis mellifera* fue suministrada por Mieles del Chaco S.A. (Chaco, Argentina).

1.2 Métodos

1.2.1 Elaboración de películas simples (PS)

Se elaboraron PS a partir de WPI (8% p/p), concentración determinada en trabajos anteriores [8], utilizando el método de moldeo y deshidratación (casting) descrito por Azeredo y col. [10]. Se preparó una solución formadora de películas (SFP) de WPI, se ajustó el pH a 7 y se desnaturalizaron térmicamente las proteínas mediante un calentamiento a 80°C por 30 min. Posteriormente, se añadieron glicerol, miel o la combinación de miel-glicerol (proporción 3:1) como plastificantes y SK como antimicrobiano (Tabla 1). Se colocaron 7 g de cada SFP en placas descartables y se secaron a 25°C y 60% de HR durante 12 h. Las películas se despegaron de las placas y se acondicionaron durante 72 h a temperatura ambiente y a una HR de 53,5-53,7 %.

Tabla 1. Formulaciones de películas a base de WPI y/o pectinas plastificadas con glicerol, miel o combinación miel y glicerol, con o sin antimicrobianos.

Formulaciones	Polímero formador		Plastificantes			Sorbato de potasio g/ 100 g SFP
	WPI g/ 100 g SFP	Pectina g/ 100 g SFP	Glicerol g/ 100 g polímero	Miel g/ 100 g polímero	Miel- Glicerol g/ 100 g polímero	
FSG	8	-	40			
FSGS	8		40			0,5
FSM	8			60		
FSMG	8				60	
FSMGS	8				60	0,5
FCG	2,08	2,08	40			
FCGS	2,08	2,08	40			0,5
FCM	2,08	2,08		60		
FCMS	2,08	2,08		60		0,5

1.2.2 Elaboración de las películas compuestas (PC)

Las PC se obtuvieron por el método de coacervación compleja descrito por Silva y col. [7]. Las dos soluciones madres, WPI (8%) y pectina (2,85%) se mezclaron de manera de obtener una proporción 1:1 con respecto al peso de cada polímero y se ajustó el pH final a 3. Seguidamente, se adicionó miel o glicerol como plastificantes y SK como antimicrobiano (Tabla 1). Se colocaron 15 g de cada formulación en placas

descartables, se secaron a 40°C y 60% de HR durante 12 h. Finalmente, las películas se despegaron de las placas y se acondicionaron de la misma forma que las PS.

1.2.3 Caracterización de las películas

1.2.3.1 Espesor, humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua

El espesor se midió al menos en cinco puntos diferentes utilizando un micrómetro (CM-8826FN, BYQTEC, China). La *humedad* de las películas se determinó por duplicado midiendo la pérdida de peso de las mismas, al secarse a 105°C. La humedad se calculó como porcentaje de agua eliminada y se expresó como g de agua por 100 g de muestra. La *solubilidad en agua* de la película se midió según Gontard y col. [11]. La medición de la *permeabilidad al vapor de agua* (WVP) se realizó por triplicado utilizando el método gravimétrico, basado en la norma ASTM E96 [8]. La WVP se expresó como g/Pa s m.

1.2.3.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron por ensayos de tracción por quintuplicado según método ASTM D882-02 [12] utilizando un Textural Analyzer CT3 (Brookfield, WI, EE.UU.) utilizando muestras de 70 mm x 10 mm. La resistencia a la tracción (TS), el módulo de Young (E) y la elongación a la rotura (EB) se obtuvieron a partir de las curvas fuerza-deformación utilizando el software Texture Analyzer CT3.

1.2.3.3 Propiedades de barrera al UV y a la luz

La *barrera a los rayos UV y a la luz visible* se midieron utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Visible (EE.UU.). El porcentaje de transmitancia (% T) de las muestras de película se midieron a 280 y a 600 nm y el valor de transparencia se calculó como $\log \%T_{600}$ dividido el espesor (mm)[7].

1.3 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la varianza utilizando el programa estadístico InfoStat (UNC, Argentina), en el cual se usó el método de comparación Tukey para evaluar las diferencias entre muestras para un nivel de significancia de 0,05.

2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Efecto del tipo de plastificante sobre las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y de barrera de las películas

Las películas obtenidas eran homogéneas y fáciles de manipular, sin embargo, las PS plastificadas sólo con miel se notaban más frágiles al desmoldarlas. En las PS, la miel produjo un deterioro de las propiedades mecánicas (Figura 1) ya que los valores de elongación resultaron muy bajos comparados a los obtenidos en las películas plastificadas con glicerol, lo que podría impedir la formación de un recubrimiento efectivo sobre los alimentos. Por esta razón se planteó la utilización de una combinación de la miel con glicerol en las películas de WPI. Cuando se utilizó esta combinación de plastificantes, las PS resultaron más resistentes respecto a las PS plastificadas solo con miel o sólo con glicerol. La elongación fue similar en las PS con glicerol. La presencia de la pectina en las PC produjo mayores valores de elongación respecto a las PS de WPI y menores valores de E para los distintos plastificantes utilizados, lo que indica una mayor flexibilidad de las películas. Las PC plastificadas con miel y las PS plastificadas con miel+glicerol presentaron el mayor valor de TS de todas las formulaciones.

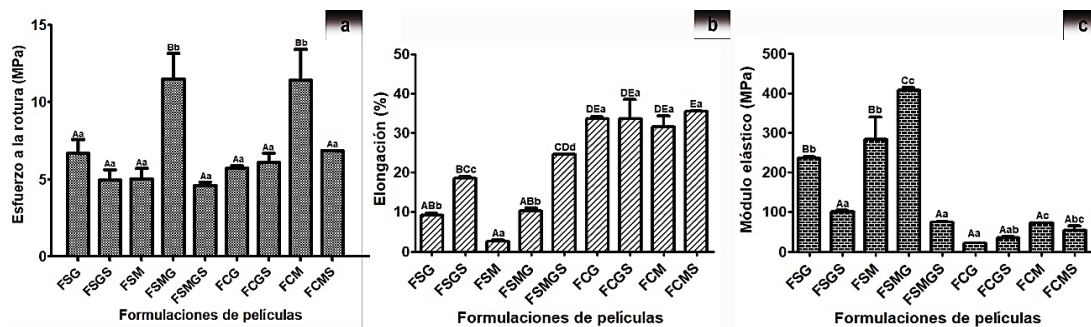


Figura 1. Propiedades mecánicas de películas a base de WPI y pectina, miel, glicerol con y sin antimicrobianos. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre todas las muestras ^(A,B) o entre todas las películas del mismo tipo, simples o compuestas ^(a,b).

El espesor de las películas obtenidas varió entre 74,87 a 91,27 μm , pero no se observaron diferencias significativas entre las muestras (Tabla 2).

Tabla N° 2. Propiedades fisicoquímicas de PS o PC a base de WPI y/o pectina, miel y/o glicerol y con o sin adición de sorbato de potasio.

Formulaciones	Espesor (μm)	Humedad (%)	Solubilidad (%)	WVP ($\times 10^{-11} \text{g./s m.Pa.}$)
FSG	89,83 \pm 7,3 6 ^{Aab}	18,31 \pm 0,96 Aa	42,78 \pm 1, 5 ^{Aab}	17,41 \pm 1,58 ^{BCc}
FSGS	80,44 \pm 0,6 1 ^{Aab}	19,8 \pm 1,18 ^A a	45,13 \pm 1, 18 ^{Aa}	18,69 \pm 0,18 ^{Cc}
FSM	91,27 \pm 8,6 5 ^{Ab}	17,96 \pm 0,72 Aa	43,1 \pm 0,7 5 ^{Aab}	8,66 \pm 0,39 ^{Aa}
FSMG	74,87 \pm 7,4 9 ^{Aab}	21,07 \pm 1,35 Aa	38,15 \pm 0, 64 ^{Aa}	11,61 \pm 1,14 ^{ACab}
FSMGS	73,4 \pm 5,49 Aa	28,05 \pm 2 ^{Bb}	53,2 \pm 6,5 8 ^{Ab}	12,83 \pm 0,64 ^{ABC} b
FCG	87,2 \pm 7,45 Aa	37,26 \pm 1,95 Cb	71,41 \pm 8, 8 ^{Ba}	28,05 \pm 1,55 ^{Dc}
FCGS	87,53 \pm 8,9 Aa	44,64 \pm 4,6 ^D c	83,49 \pm 2, 31 ^{Ba}	18,53 \pm 1,16 ^{Cb}
FCM	80,93 \pm 8,97 ^{Aa}	17,47 \pm 0,42 Aa	74,35 \pm 2,5 2 ^{Ba}	27,23 \pm 3,15 ^{Dc}
FCMS	82,73 \pm 5,5 9 ^{Aa}	16,45 \pm 1,82 Aa	79,62 \pm 2,4 Ba	7,25 \pm 0,06 ^{Aa}

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre todas las muestras (A,B) o entre todas las películas del mismo tipo, simples o compuestas (a,b).

En cambio, la adición de glicerol produjo cambios significativos en la humedad, dando valores superiores para las PC con este plastificante. Esto puede deberse a la naturaleza hidrofílica del glicerol que tiende a formar puentes de hidrógeno con el agua y aumentar la humedad de las mismas [13]. La solubilidad de las PC fue superior a la de las PS (Tabla 2). Esto es debido a la presencia de pectina, la cual presenta un alto grado de higroscopicidad y a que al reducir el pH de la solución de WPI y realizar el tratamiento térmico, la proteína se desplegó y expuso su carga positiva, lo que permitió la interacción con la pectina y la formación del complejo proteína-polisacárido reduciendo así los enlaces disulfuro y el poder de la red de proteínas. Los valores de solubilidad de las PC fueron similares a los obtenidos por Silva y col. [7].

Las PC mostraron mayor WVP que las PS, probablemente porque se reduce la cohesión estructural de la matriz proteína-proteína, aumentando el volumen libre hasta la difusión de vapor. Además, las moléculas de pectinas son altamente hidrofílicas, lo que favorece las interacciones con las moléculas de vapor de agua. La miel produjo una disminución significativa de la WVP en las PS en comparación con las plastificadas con glicerol. Las PS de WPI que contenían miel resultaron menos permeables al vapor de agua en un 50 % en comparación con las plastificadas con glicerol, mientras que, las películas plastificadas con miel y glicerol disminuyeron un 43 % la WVP.

Un comportamiento similar fue observado por Soinin, Heinämäki y Yliruusi [9] y Osuna y col. [8] cuando utilizaron miel como plastificante de películas de WPI. La presencia de miel perturba la difusión del agua a través de la película y se refleja en una velocidad de transmisión de vapor de agua más bajo [14].

Todas las películas eran transparentes (Figura 2, derecha), pero la adición de SK produjo en las PS reducción de la transparencia volviéndose algo traslúcidas, opacas y amarillentas. Todas las PC eran amarillentas por la presencia de la pectina, pero transparentes. La barrera a los rayos UV y la transparencia de las películas expresadas mediante la Transmitancia a 280 y 600 nm respectivamente se muestran en la Figura 2.

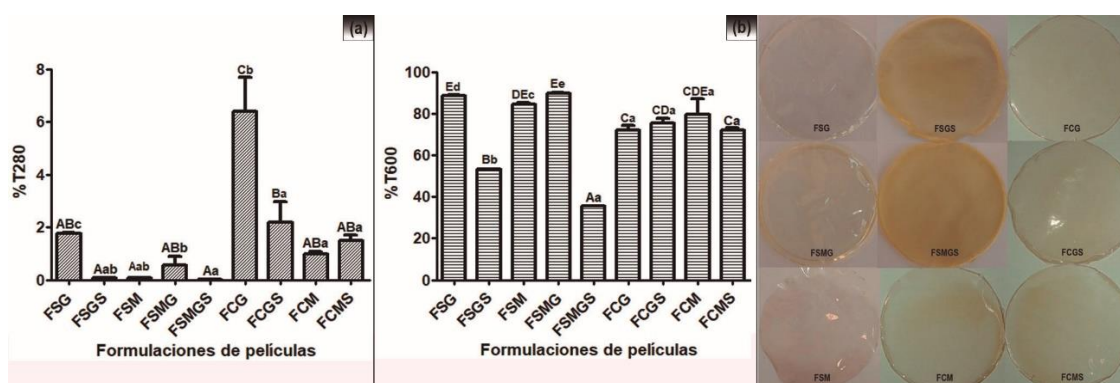


Figura 2. Transmitancia a 280 nm (a) y a 600 nm (b) y fotos de la apariencia visual de las películas obtenidas. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre todas las muestras ^(A,B) o entre todas las películas del mismo tipo, PS o PC ^(a,b).

Si bien todas las muestras absorbieron radiación UV, las películas plastificadas con miel presentaron mayor absorbancia a la radiación que aquellas plastificadas con glicerol, ya que se pudo verificar una reducción significativa de la Transmitancia a 280. Las PS de WPI con glicerol o miel+glicerol mostraron una transparencia excelente con un 88,7 % y 89,9 del T600 respectivamente, mientras que, las PC mostraron una transparencia de alrededor del 75% y no fueron afectadas por la incorporación de miel. Por lo tanto, las películas plastificadas con miel presentaron una mejor barrera a los rayos UV, lo que podría dar mayor protección al alimento que las películas plastificadas con glicerol.

2.2 Efecto del agregado de sorbato de potasio sobre las propiedades mecánicas y fisicoquímicas de las películas

La incorporación de SK modifica las propiedades mecánicas de las PS plastificadas con miel y glicerol o sólo glicerol, produciendo una disminución en E y TS y un aumento en la EB, por lo tanto, se comporta como plastificante (Figura 1). El SK puede modificar la red de polímeros al interrumpir y disminuir la intercadena del polímero, actuando como plastificante [15]. Por otra parte, la adición de SK produjo un aumento de la humedad en las PC plastificadas con glicerol y las PS plastificadas con miel y glicerol (Tabla 2). La adición de SK sólo afectó la solubilidad de las PS plastificadas con miel y glicerol, aumentando su valor. Los resultados de humedad y solubilidad fueron similares a los obtenidos por Kowalczyk y col. [16] para películas de gelatina adicionada con SK. El carácter hidrofílico del SK podría facilitar el acceso de las moléculas de agua a la matriz polimérica, lo que dio como resultado una hidratación acelerada y, posteriormente, la lixiviación de los constituyentes de la película.

La incorporación de SK produjo una disminución significativa de la WVP en las formulaciones de PC respecto a su misma formulación sin adición del antimicrobiano. Además, el SK aumentó la absorción de la radiación UV, reduciendo significativamente %T280 y también afectó la transmisión de la luz visible (%T600) en las PS, es decir, las volvió menos transparentes. La adición de SK produjo una reducción de entre 40% al 54% de la transmisión de la luz visible en las PS. Las películas con menor transparencia presentan mejor barrera a la radiación UV que aquellas con mayor transparencia [7], esta tendencia se observó en nuestro estudio al

adicionar SK. Si bien, la transparencia es positiva para el control visual del estado del alimento, una alta transparencia en envases puede facilitar la fotooxidación de productos alimenticios ricos en grasas [17]. Por lo que las PS de WPI plastificadas con miel y/o glicerol adicionadas con SK pueden ser excelentes envases para alimentos ricos en grasas.

CONCLUSIÓN

La adición de la miel de *Apis mellifera* y/o el sorbato de potasio modificó las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y ópticas de las películas simples y compuestas a base de WPI analizadas. En comparación con las películas simples con glicerol, la miel produjo películas más elásticas, menos rígidas, menos permeables al vapor de agua y con mayor barrera a la luz UV. Por otro lado, el sorbato de potasio aumentó la humedad en las películas compuestas con glicerol y la solubilidad en películas simples con miel+glicerol; mientras que, produjo películas compuestas menos permeables al vapor de agua y, películas simples y compuestas con miel menos rígida. Además, las películas con miel y SK presentaron la mayor barrera a la luz UV dando mayor protección al alimento contra la oxidación. Estos resultados sugieren que estas películas pueden explotarse como nuevos biomateriales activos para la protección de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Nawab, F. Alam, M. Haq, Z. Lutfi, and A. Hasnain, *Int. J. Biol. Macromol.*, **98**, 869, 2017.
- [2] W. Cruz Diaz, *Cinética de liberación de extractos de propóleos desde una película base almidón*, Universidad De La Habana, La Habana, 2014.
- [3] B. Hassan, S. Chatha, A. Hussain, K. Zia, and N. Akhtar, *Int. J. Biol. Macromol.*, **109**, 1095, 2018.

- [4] M. Perez-Gago, M. Serra, M. Alonso, M. Mateos, and M. del Río, *Postharvest Biol. Technol.*, **36** (1), 77, 2005.
- [5] J. Rubilar, R. Zúñiga, F. Osorio, and F. Pedreschi, *Carbohydr. Polym.*, **123**, 27, 2015.
- [6] P. Perez Espitia, W. Du, R. Avena-Bustillos, N. Ferreira Soares, and T. McHugh, *Food Hydrocoll.*, **35**, 287, 2014.
- [7] K. Silva, T. Fonseca, L. Amado, M. Mauro, *Food Packag. Shelf Life*, **16**, 122, 2018. [8] M. Osuna, A. Michaluk, A. Romero, M. Judis, and N. Bertola, *Biopolymers*, **113**(8), e23519, 2022.
- [9] J. Soininen, J. Heinämäki, and J. Yliruusi, *Food Bioprod. Process.*, **91** (4), 440, 2013.
- [10] H. Azeredo, R. Morrugares-Carmona, N. Wellner, K. Cross, B. Bajka, K. Waldron, *Food Chem.*, **198**, 101, 2016.
- [11] N. Gontard, C. Duchez, J. Cuq, S. Guilbert, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **29**, 39, 1994.
- [12] ASTM International, *ASTM D882-18*. 2018.
- [13] F. Biodegradáveis and À. Amido, *Biotecnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, **10** (1), 182, 2012.
- [14] N. Mohd Azam and K. Amin, *Int. Conf. Innov. Res.*, **209** (1), 1, 2017.
- [15] E. Chevalier, A. Chaabani, G. Assezat, F. Prochazka, and N. Oulahal, *Food Packag. Shelf Life*, **16** (January), 41, 2018.
- [16] D. Kowalczyk, M. Kordowska-Wiater, M. Karaś, E. Zięba, M. Meżyńska, and A. Wiącek, *Food Hydrocoll.*, **101**, 105539, 2020.
- [17] P. Velásquez, G. Montenegro, L. Valenzuela, A. Giordano, G. Cabrera-Barjas, and O. Martin-Belloso, *Food Hydrocoll.*, 124 (October), 2022.