# BIO-PELÍCULAS PARA EL ENVASADO DE ALIMENTOS: PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

**Palabras clave:** caseinato de sodio, quitosano, películas, biodegradable.
**Key words:** sodium caseinate, chitosan, films, biodegradable.

**Se utilizaron materiales provenientes de recursos renovables y desechos industriales para el desarrollo de películas poliméricas naturales y biodegradables con potencial aplicación en el envasado de alimentos. En particular se seleccionaron un derivado de la caseína que es la proteína que se encuentra en mayor concentración en la leche, denominado caseinato de sodio y, por otra parte un carbohidrato que se obtiene a partir del tratamiento de algunos desechos de la industria marina (principalmente caparazones de crustáceos), denominado quitosano, para preparar películas puras y compuestas.**
**Estas películas son transparentes aunque ligeramente coloreadas, y se biodegradan rápidamente en el suelo. Sin embargo, difieren en otras propiedades (resistencia mecánica, propiedades biocidas, solubilidad en agua) dependiendo de su composición química. Aún así, es posible aprovechar la capacidad formadora de películas del caseinato de sodio, del quitosano o de sus mezclas para formular materiales aplicables al envasado y recubrimiento de alimentos.**

**Mariana Pereda[1], María del Rosario Moreira[2], Sara I. Roura[2], Norma Marcovich[1], Mirta I. Aranguren[1].**

[1]Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA) - CONICET - Facultad de Ingeniería (UNMdP), División Ecomateriales.
[2]Grupo de Ingeniería en Alimentos- CONICET, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP).
Av. Juan B. Justo 4302, (7600) Mar del Plata, ARGENTINA.

**Materials from renewable resources and industrial wastes were used in the formulation of natural and biodegradable polymer films with potential application in food packaging. In particular, sodium caseinate derived from casein (the main milk protein), and chitosan, a carbohydrate derived from chitin, which is obtained from wastes of the fishing activity (mainly from the shrimp shells), were selected to prepare neat and composite films.**
**All these films are transparent but slightly colored and they are rapidly biodegraded in soil. However, they can show other very different properties, such as mechanical strength, biocide properties or water solubility, depending on their chemical composition. In any case, it is possible and convenient to take advantage of their interesting properties as film formers to formulate materials applicable to food packaging and coating.**

## INTRODUCCIÓN

### USO DE MATERIAS PRIMAS PROVENIENTES DE LA BIOMASA.

Nuestro planeta es inmensamente rico en cuanto a la variedad de organismos vivos que continuamente generan productos químicos y materiales que son fuente de materias primas para las más diversas industrias, desde las que podríamos considerar típicas de alimentos y textiles hasta la farmacéutica, de energía y de materiales. El aprovechamiento eficiente y completo de un recurso natural renovable es lo que ha dado origen al relativamente moderno concepto de bio-refinería. En este artículo nos vamos a enfocar específicamente, al desarrollo de materiales a partir de diferentes bio-recursos.

Si bien los primeros polímeros que los seres humanos aprovechamos eran de origen biológico, esto cambió rápidamente para dar lugar a los sintéticos basados en el petróleo. El ingenio humano consiguió desarrollar materiales con las diferentes propiedades mecánicas deseadas y con excelente durabilidad. Sin embargo, ese logro resultó ser problemático para el cuidado del medio ambiente, y la estabilidad de los polímeros pasó de ser un bien buscado a un problema en busca de solución. Esta nueva visión integral de los materiales

desde su producción hasta su disposición final ("from craddle to grave") sumado al aumento de la preocupación del público en general por estas cuestiones y a los vaivenes del precio del petróleo dieron por resultado un renacimiento de los materiales obtenidos a partir de recursos naturales renovables.

Es en este contexto que el personal de la División Ecomateriales de INTEMA se dedica desde hace unos veinte años a la investigación y desarrollo de materiales obtenidos a partir de la biomasa vegetal y animal.

En este trabajo resumimos los resultados que obtuvimos a partir de la utilización de un derivado de una proteína de la leche (caseinato de sodio, Cas) y de un polisacárido de origen animal (quitosano, Quit). Las películas obtenidas son transparentes aunque ligeramente coloreadas y se biodegradan rápidamente en el suelo. Se proponen como materiales descartables para el envasado de alimentos y también como recubrimientos comestibles.

## ■ POLÍMEROS OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNAS. CASEINATO DE SODIO.

Las proteínas son heteropolímeros que se componen de más de 20 aminoácidos diferentes, cada uno con determinadas secuencias y estructuras. Debido a esta diversidad molecular, las proteínas tienen un potencial considerable para la formación de enlaces que difieren con respecto a su posición y naturaleza. Entre las proteínas más utilizadas en la producción de películas comestibles o recubrimientos se encuentran las de gelatina (Bigi y col., 2004; Bergo y Sobral, 2007), las de gluten de trigo (Hernández-Muñoz y col., 2004; Mujica Paz y col., 2005), las de soja (Denavi y col., 2009; Denavi, Tapia-Blácido y col., 2009) y las de caseína (Barreto y col., 2003; Barreto, Pires y Soldi, 2003) entre otras varias posibilidades.

El caseinato de sodio es un polímero soluble en agua, comercialmente disponible, obtenido por la precipitación ácida de la caseína, la principal proteína en la leche de vaca (24-29 g/l) (Audic y Chaufer, 2005) (ver Figura 1).

El caseinato es un material renovable y biodegradable, pero además debido a las características de la caseína (una proteína globular, no estructurada) es un buen formador de películas que muestran transparen-

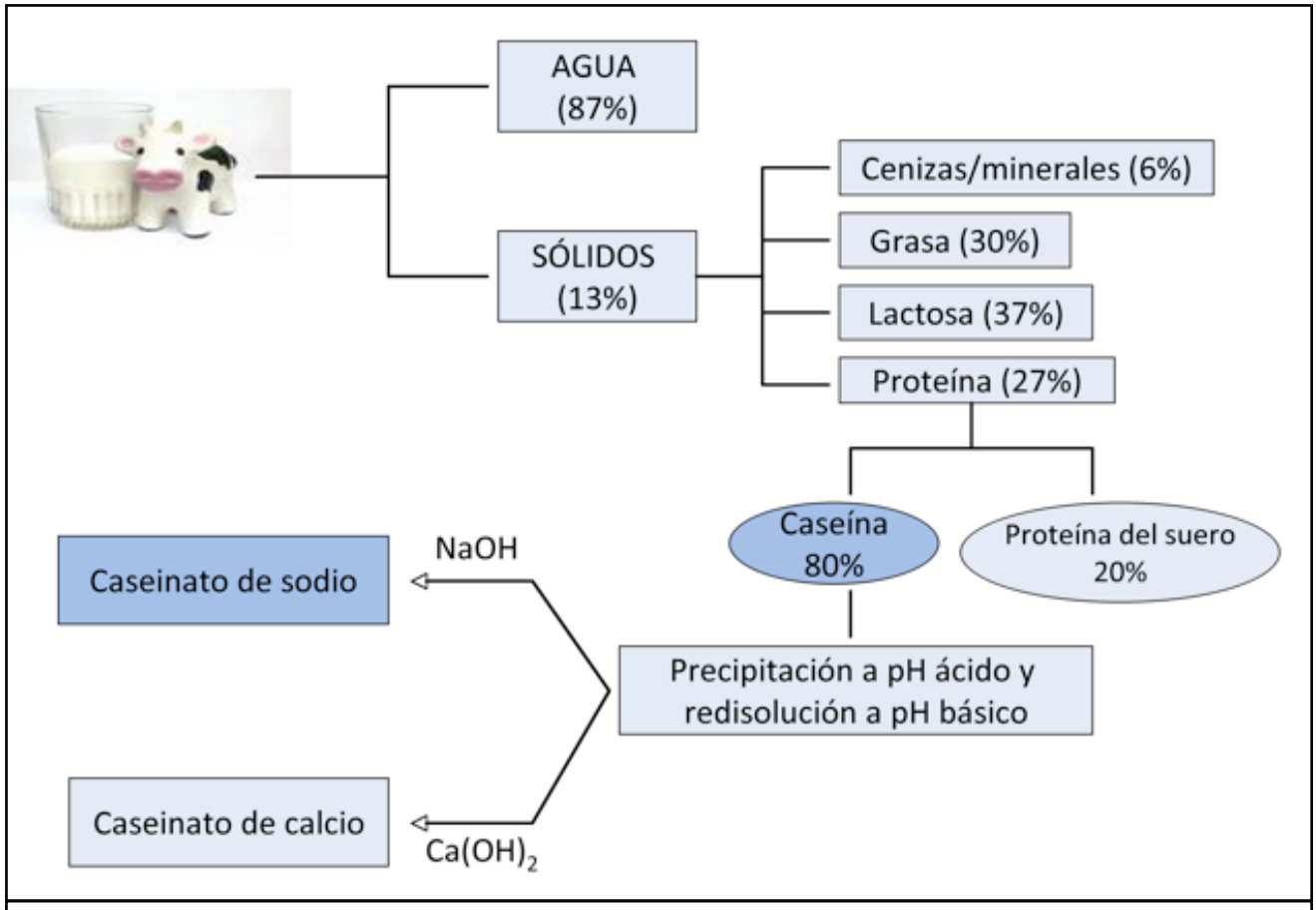


**Figura 1:** Obtención de caseinato de sodio a partir de la leche (Pereda, 2010).

**Figura 2:** Película transparente de caseinato de sodio plastificada con glicerol (Pereda, 2010).

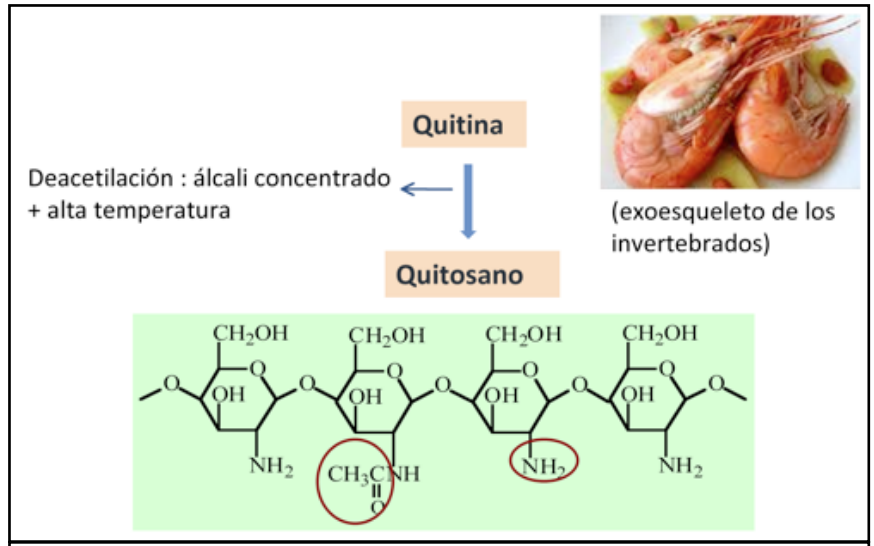


**Figura 3:** Estructura química del quitosano (Pereda, 2010).

cia (Figura 2), buenas propiedades de barrera a los gases ($O_2$) (Chick y Ustunol, 1998), elevada calidad nutricional y excelentes propiedades sensoriales.

## ■ POLÍMEROS OBTENIDOS A PARTIR DE POLISACÁRIDOS. QUITOSANO.

Los polisacáridos son polímeros naturales que cumplen funciones en los organismos vivos como alimentos ricos en energía (ej.: almidón en las plantas y glucógeno en animales) o como componentes estructurales en la pared celular de las plantas (celulosa, pectina) o en el exoesqueleto de los insectos y crustáceos (quitina) (Wong y col., 1992; Nelson y Cox, 2000; Dutta y col., 2009; Hirano, 1989).

El quitosano, que se obtiene a partir de la quitina, es un polisacárido lineal que consta de unidades repetitivas de β(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa (cuando está completamente deacetilado). Su estructura química se presenta en la Figura 3.

Debido a su estructura lineal, le es posible formar películas resistentes, flexibles y transparentes (Figura 4).

Este polisacárido, naturalmente no tóxico y biodegradable, ha sido ampliamente utilizado en la preparación de películas y recubrimientos antimicrobianos debido a su propiedad de inhibir o retrasar el crecimiento de hongos y de numerosas bacterias patógenas en la superficie del producto, extendiendo así su vida útil.

## ■ NECESIDAD DE PLASTIFICANTES

Tanto las películas obtenidas a partir de caseinato como las obtenidas a partir de quitosano resultan materiales de alto módulo, pero muy frágiles. Esto ocurre por las fuertes interacciones entre las cadenas moleculares (puentes hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y posibles puentes disulfuro en el caso de las proteínas) (Gennadios, 2002). Esta fragilidad hace a estas películas inviables para ser utilizadas en envases, ya que se agrietan y resquebrajan durante su manipulación. La técnica habitual para mejorar la flexibilidad y extensibilidad de las películas es agregar un plastificante. Los plastificantes son líquidos hidrofílicos de bajo peso molecular que reducen

**Figura 4:** Película transparente de quitosano plastificada con glicerol.

la interacción entre las cadenas. La plastificación resulta de la capacidad de las moléculas de plastificante hidrofílico de compartir puentes de hidrógeno con la red polimérica (Mangavel, 2003). El resultado es un aumento del volumen libre y de la movilidad de las cadenas de polímero, lo que por otro lado reduce la temperatura de transición vítrea del material y lleva a obtener películas más flexibles aunque con menor resistencia mecánica.

La Figura 5 ilustra el efecto del

agregado de diferentes concentraciones de glicerol en una película de caseinato de sodio y la flexibilización que resulta de esta plastificación. Agregando alrededor del 15 % en peso de glicerol se ve un cambio cualitativo del comportamiento de la película que presenta un esfuerzo de fluencia y una zona de deformación plástica.

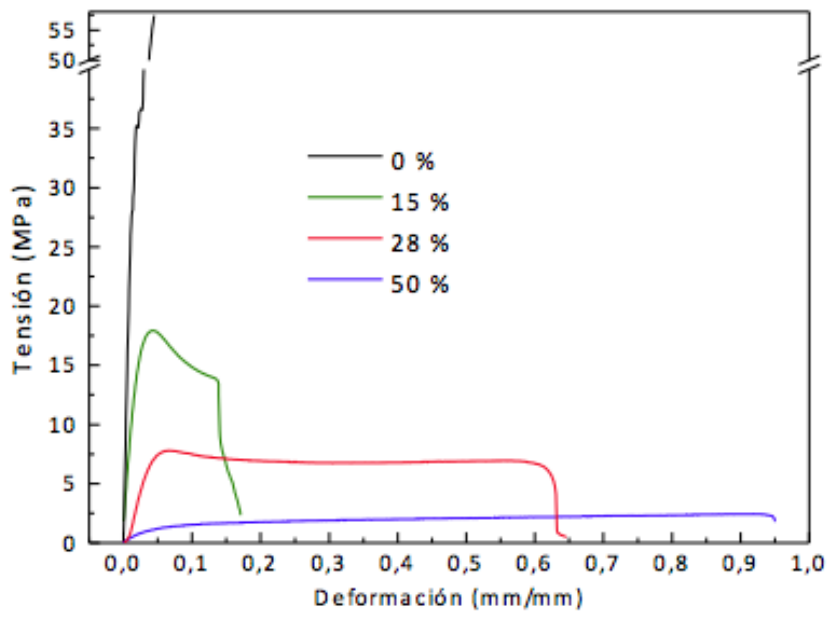


**Figura 5:** Propiedades mecánicas en tracción de películas de caseinato con diferente contenido de plastificante (Pereda y col., 2008).

Los plastificantes más comúnmente utilizados son los alcoholes poli-funcionales, como el polietilenglicol, glicerol y sorbitol (Sothornvit y Krochta, 2000; Anker, 1998; Pommet, 2003; Irissin-Mangata, 2001, Pereda y col., 2008; Pereda y col., 2009).

Por otro lado, el aumento en la flexibilidad de la película también está acompañado por un aumento en su permeabilidad, que depende del tipo y del contenido de plastificante (Mc Hugh y Krochta, 1994; Sothornvit y Krochta, 2000). Por esto es necesario optimizar el uso de plastificante para ofrecer un correcto equilibrio entre las propiedades mecánicas y de barrera, de acuerdo a los requerimientos de la aplicación para la cual se diseña la película (Gennadios, 2002; Sothornvit y Krochta, 2000; Maté y Krochta, 1996; Irissin-Mangata, 2001; Hernández-Muñoz y Hernández, 2002).

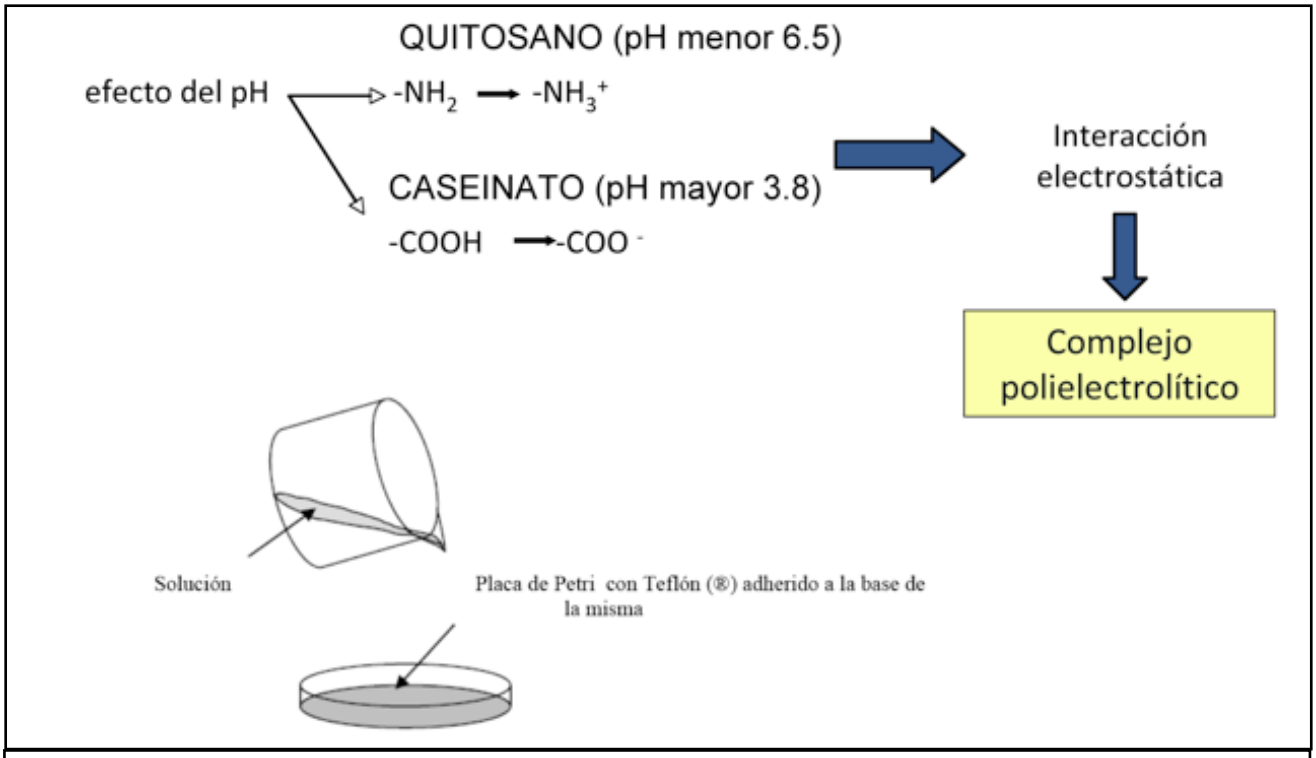


**Figura 6:** Producción de películas complejas (Pereda, 2010).

## ■ PELÍCULAS HÍBRIDAS PROTEÍNA/CARBOHIDRATO.

Las proteínas y los polisacáridos generalmente forman películas con buenas propiedades mecánicas pero con propiedades de barrera pobres debido a su hidrofilicidad. Una alternativa para diseñar biopelículas capaces de controlar el balance de humedad en el producto puede ser la optimización de las interacciones desarrolladas entre biopolímeros aprovechando las características iónicas de ciertas macromoléculas. Específicamente en nuestro caso, el quitosano actúa como polímero catiónico y es capaz de establecer interacciones electrostáticas a través de sus grupos $NH_3^+$ con los grupos aniónicos, como $COO^-$, presentes en la proteína a pH superiores al punto isoeléctrico (Figura 6). Estas interacciones son responsables de la formación de complejos poliméricos polielectrolíticos (Li y col., 1992; Dumitriu y col., 1994; Remuñán-López y col., 1998), que han sido escasamente estudiadas en combinaciones quitosano-proteína (Kim y col., 2005, Pereda y col., 2008; Pereda y col., 2009; Pereda y col., 2011).

En las secciones siguientes, se presentarán en forma resumida los resultados obtenidos al preparar y caracterizar películas comestibles basadas en caseinato de sodio y quitosano que aprovechan las principales ventajas de ambos componentes: la alta disponibilidad de la caseína y las propiedades antimicrobianas del quitosano. Las características de las películas combinadas quitosano-caseinato se presentan realizando un análisis comparativo respecto a las películas puras de quitosano y caseinato, para facilitar así la discusión de los resultados obtenidos.

## ■ PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS

La preparación del complejo polielectrolítico a partir de caseinato de sodio y quitosano requiere un control cuidadoso del pH de las soluciones. El caseinato de sodio es estable a pH 6.5 (Guo y col., 1989) y es altamente insoluble en su punto isoeléctrico (pI) que corresponde a un pH entre 3.8 y 4.0 (Lieske y Konrad, 1994). El quitosano muestra su mayor solubilidad en una solución al 1% (v/v) de ácido acético (pH 4.4) pero permanece soluble a pH menor a 6.5 como se indica en la Figura 6. Dado que el quitosano es un biopolímero catiónico, mientras que el caseinato actúa como macroanión en las condiciones de mezclado (pH>pI), se espera una complejación entre ambos polímeros como resultado de su mezcla íntima (Srinivasa y Tharanathan, 2007).

Las soluciones de caseinato de sodio y de quitosano con concentraciones de 2.5 % (p/v) de proteína en agua y 2 % (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), respectivamente, se mezclaron en volúmenes iguales mediante agitación magnética (350 rpm) obteniendo una relación Quit-Cas de 0.8. La solución mezcla poseía un pH de 5.0 y no se observó separación de fases. Luego se procedió al agregado del plastificante en una relación en peso glicerol/(quitosano + proteína) de 0.28, lo cual representa el 22 % respecto del peso del sólido total. La solución mezcla se volcó en placas de Petri y el solvente se evaporó en estufa de convección a 35 °C durante un tiempo aproximado de 10 horas.

## ■ CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS

## ■ PROPIEDADES RELACIONADAS CON EL ASPECTO DE LAS PELÍCULAS.

Todas las películas resultaron transparentes con una tonalidad que se vuelve ligeramente amarillenta a

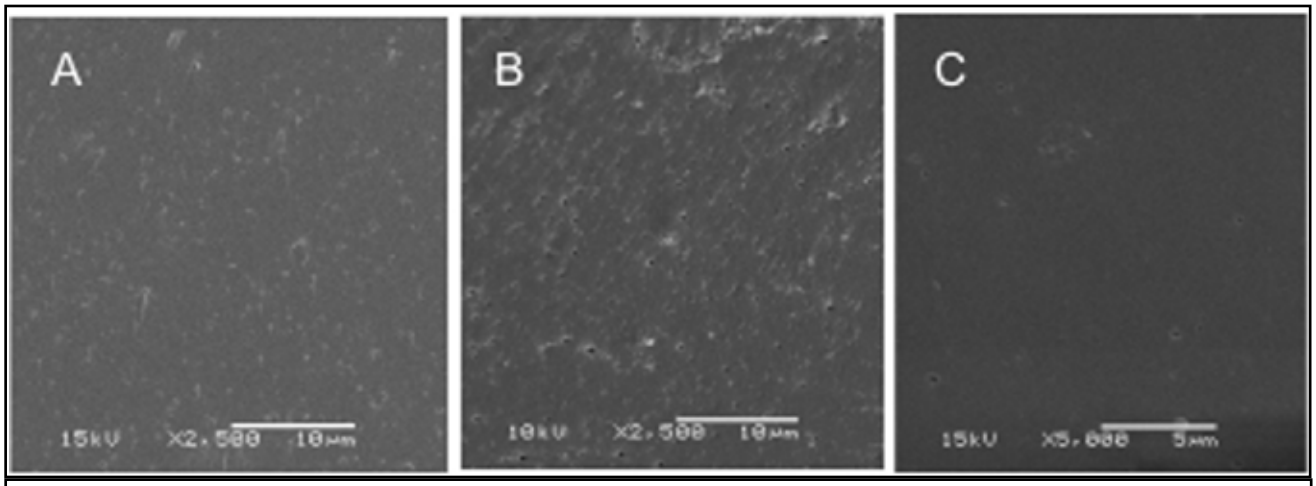


**Figura 7:** SEM de superficies de fractura criogénica de películas plastificadas. A) Caseinato; B) Quitosano; C) Quitosano/caseinato.

medida que aumenta el contenido de quitosano en el film y sin imperfecciones que puedan detectarse a simple vista. Un análisis más profundo, realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM), permitió confirmar que todas las películas presentaron una morfología superficial lisa y uniforme, como se muestra en la Figura 7. Tampoco se observaron fases separadas en la película híbrida como se esperaba de una película obtenida a partir de la complejación de los dos polímeros.

La transparencia es una propiedad de gran interés en el estudio de materiales en contacto con alimentos, debido a su gran impacto sobre la apariencia del producto cuando se las utiliza como recubrimientos o envases (Mali y col., 2004). De la misma forma el color de la película puede afectar positiva o negativamente la decisión del consumidor a la hora de seleccionar un alimento envasado. Los resultados de estas determinaciones indican que la película mezcla presenta un opacidad intermedia entre la de los dos componentes, al igual que la intensidad del color amarillo (que es máxima para la película de quitosano) (Figura 8). El color amarillento del quitosano se atribuye a los grupos amino libres, que son susceptibles al pardeamiento mediante la reacción de Maillard, como establecieron Prodpran y col (2007).

## ■ PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS PELÍCULAS.

Una buena forma de evaluar la integridad de las bio-películas en ambientes acuosos es la determinación de la materia soluble total (TSM). Esta técnica, que consiste básicamente en sumergir el material, previamente pesado, en agua durante 24 h, retirarlo al finalizar el ensayo, secarlo y volverlo a pesar, puede usarse además como una indicación cuantitativa del grado de complejación entre el caseinato y quitosano. La película de quitosano resulta parcialmente soluble en agua destilada (se disuelve el 16.2% de su masa) mientras que la película de caseinato se disuelve en su totalidad. Sin embargo, la película compleja se disuelve sólo en un 14.7%, un valor cercano al medido en la película de quitosano y no intermedio entre los correspondientes a las películas preparadas con un único bio-polímero, lo cual confirma, al menos, el desarrollo de interacciones electrostáticas fuertes entre el quitosano y el caseinato. Estas interacciones pueden ser físicas (electrostáticas) o químicas resultantes de la reacción entre los grupos aminos del quitosano y los grupos carboxilos del caseinato vía reacción de Maillard dando lugar a entrecruzamientos covalentes. Esta reacción ocurriría con mayor probabilidad durante el secado de la película (Prodpran y col., 2007).

Las medidas de ángulo de contacto son un buen indicador del carácter hidrofílico de la superficie de las películas (Ghanbarzadeh y col., 2007) y permiten complementar los resultados obtenidos mediante otras técnicas. La Tabla 1 resume los valores de ángulo de contacto con etilenglicol (solvente polar) determinados por goniometría. El menor ángulo corresponde a películas de caseinato (26.3°) que resultaron ser las películas con mayor polaridad superficial; las películas de quitosano o quitosano-caseinato presentaron superficies mucho mas hidrofóbicas, siendo la película híbrida la que exhibió el mayor valor de ángulo de contacto (y no un valor intermedio como podría esperarse). Esta es una característica deseable en películas que estarán en contacto con alimentos y constituye una mejora respecto de las películas basadas en caseinato cuya principal desventaja es su alta higroscopicidad.

**Figura 8:** Foto de película hibrida de Quit-Cas (Pereda, 2010).

También se evaluó la absorción de agua de las películas durante su almacenamiento en un ambiente de humedad y temperatura controladas (75% y 23°C). Las películas alcanzaron su contenido de humedad de equilibrio (EMC) relativamente rápido, aproximadamente a los 400 min; estos valores fueron aproximadamente 25 % para películas Quit-Cas y 54% para películas de quitosano, siendo este último valor comparable a datos reportados por Vargas y col. (2009). Es obvio que las fuertes interacciones desarrolladas entre el caseinato y el quitosano al formar la película compleja dejan disponibles comparativamente pocos sitios en la matriz polimérica (con respecto a las películas individuales) en los que pueda retenerse el agua y por lo tanto se observa un contenido final de agua reducido.

Se midió además la permeabilidad al vapor de agua de las películas híbridas, de caseinato y de quitosano. El mayor valor de permeabilidad al vapor de agua correspondió a la película de quitosano, debido a su naturaleza hidrofílica, incluso ma-

**TABLA 1**
Materia soluble total (TSM), ángulo de contacto con etilenglicol (θ), contenido de humedad de equilibrio (EMC) y permeabilidad al vapor de agua (WPV) de las películas obtenidas.

| Película | TSM (%) | θ (°) | EMC (%) | WVP (g.m/Pa.s.m2) x 1010 0/ 64.5% RH |
|---|---|---|---|---|
| Cas | 100.0 ± 0.0 | 26.3 ± 1.6 | 25.1 ± 0.9 | 1.29 ± 0.23 |
| Quit | 16.2 ± 0.5 | 65.7 ± 3.0 | 54.0 ± 2.8 | 1.90 ± 0.10 |
| Quit-Cas | 14.7 ± 2.0 | 67.1 ± 1.2 | 22.2 ±0.7 | 1.66 ± 0.08 |

yor que la del caseinato (Butler y col., 1996). En este caso, el valor de permeabilidad de la película híbrida sí resultó intermedio con respecto a los valores medidos en las películas puras; en otras palabras, no se observó efecto sinérgico.

## ■ PROPIEDADES RELACIONADAS CON EL DESEMPEÑO MECÁNICO: TRACCIÓN E IMPACTO

Las propiedades deseadas en un material para envasado dependen de la aplicación a la que van a ser destinadas. En general, un envase para alimentos debe ser un material no excesivamente deformable, para proveer integridad estructural o reforzar la estructura alimenticia (ej.: bandejas, recipientes) o, por el contrario, una película altamente deformable para aplicaciones tales como envoltura de alimentos (Mali y col., 2004).

La Figura 9 muestra el comportamiento en tracción comparativo de las películas plastificadas de Cas, Quit y Quit-Cas. El material combinado muestra resistencia mejorada con respecto a las películas simples. Es interesante notar, también en este caso, que las propiedades mecánicas de la película híbrida no son intermedias con respecto a las propiedades de los constituyentes individuales, sino que la complejación favorece el desarrollo de efectos sinérgicos que mejoran el comportamiento con respecto al de los componentes puros. Este es el resultado de las interacciones catiónico-aniónicas que pueden establecerse entre las dos macromoléculas, que, en este caso, se traduce en un aumento en la resistencia del material. Aunque menos extensibles que las películas de caseinato, las películas complejas aún alcanzan una deformación última del 50 %, lo cual permite su fácil manipulación sin riesgos de quebrarlas. Prodpran y col (2007) también encontraron que la incorporación de quitosano a películas proteicas reducía su capacidad de estiramiento y Srinivasa y col (2007) informaron que la elongación de películas de polivinilalcohol se reducía cuando se incorporaba quitosano a las mismas. La tabla 2 resume los resultados de las propiedades mecánicas obtenidas en ensayos de tracción. Los valores del módulo elástico relacionados con la rigidez del material son muy similares para las películas de caseinato y quitosano y, como resultado, la película compleja muestra un valor muy similar (considerando los errores experimentales).

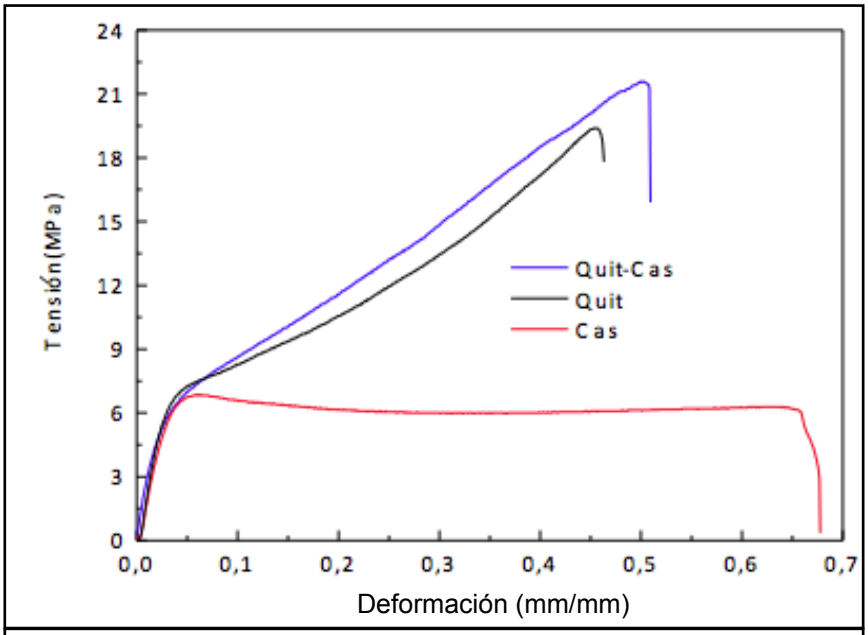


**Figura 9:** Comportamiento mecánico en tracción de películas de Quit, Cas y Quit-Cas plastificadas con glicerol y acondicionadas a 23°C y 50 % HR (Pereda y col., 2008).

Estudios en otras películas complejas, como gelatina-quitosano, han revelado propiedades intermedias respecto de las propiedades de las películas puras (Arvanitoyannis y col., 1998). Sin embargo, nosotros encontramos que la resistencia y el módulo en tracción de las películas complejas Quit-Cas son comparables o levemente mejores que los correspondientes a las películas de quitosano.

Los resultados de los ensayos de impacto, obtenidos mediante la medición de la energía que consume un dardo de masa conocida arrojado súbitamente desde una altura preimpuesta en dirección paralela al espesor de la película al atravesarla, se presentan en la Figura 10. En ella se aprecia claramente la gran mejora obtenida al mezclar los dos componentes naturales: las películas híbridas se presentan como mucho más tenaces que las preparadas a partir de los constituyentes individuales, como lo indica el importante aumento en el área bajo la curva carga vs. deflexión. La Tabla 3 resume los resultados calculados a partir de las curvas de impacto. Las películas de Quit-Cas presentan una resistencia al impacto ($s_d$) y una energía consumida para iniciar la fisura ($E_i$) mayores que las correspondientes a las películas de Cas y Quit. Por otra parte, la película compleja sigue el mismo comportamiento de fractura frágil (sin energía de propagación) que la película de quitosano. Estos resultados están en concordancia con la mejora de las propiedades en tracción observadas para la película compleja y constituyen un incentivo importante para la utilización de este material como alternativa a las películas preparadas con cualquiera de los componentes individuales.

## ■ DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES

*Ensayos in vitro:*

Para determinar la efectividad antimicrobiana de las películas comestibles mediante ensayos "in vitro" se utilizaron dos métodos comúnmente utilizados para tal fin: ensayo de difusión en agar y ensayo de dilución en caldo. El primero de ellos consiste en la difusión del material a evaluar a través del agar (habiendo colocado previamente sobre el mismo una pátina de un microorganismo indicador) mientras que el segundo consiste en la difusión de la solución formadora de película en un caldo (colocando en un tubo de ensayo el medio de cultivo, el microorganismo indicador y la solución formadora de película) de modo tal que haya un contacto directo. Para determinar la eficiencia de las películas como inhibidoras del crecimiento microbiano seleccionamos alimentos con diferente composición: zanahoria, queso cheddar y salame de Milano, de los que se obtuvo una microflora nativa enriquecida que fue posteriormente utilizada para las pátinas. Las películas se cortaron asépticamente en

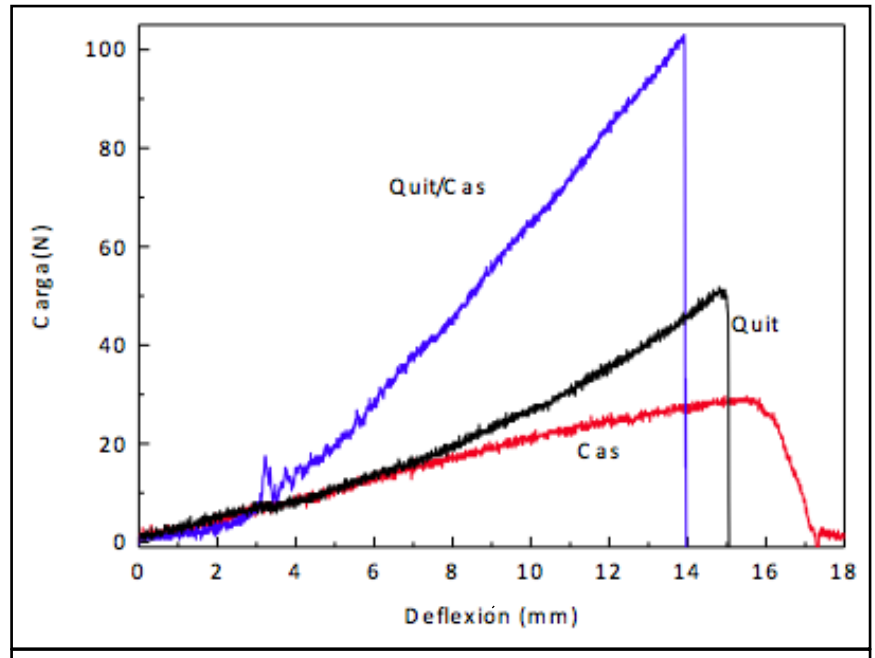


**Figura 10:** Comportamiento mecánico en impacto de películas de Quit, Cas y Quit-Cas, plastificadas con glicerol, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR (Pereda y col., 2008).

**TABLA 2**
Propiedades de tracción de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, con una relación en peso de glicerol (%) de 28, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

| | E (MPa) | σb (MPa) | εb (%) |
|---|---|---|---|
| Cas | 250.9± 20.3 | 6.2± 0.2 | 63.2± 6 |
| Quit | 229.8± 56.1 | 17.3± 2.8 | 44.2± 7.8 |
| Quit/Cas | 223.6± 63.8 | 19.6± 2.8 | 47.9± 5.7 |

**TABLA 3**
Propiedades de impacto de películas de Cas, Quit y Quit-Cas, plastificadas con glicerol, y acondicionadas a 23°C y 50 % HR.

| Películas | $\sigma_d$ (GPa) | $E_i$ x $10^3$ (J/mm) | $E_p$ x $10^3$ (J/mm) | $E_t$ x $10^3$ (J/mm) |
|---|---|---|---|---|
| Quit | 26.6 ± 3.5 | 4.6 ± 0.7 | 0 ± 0 | 4.6 ± 0.7 |
| Quit/Cas | 35.6 ± 5.3 | 6.7 ± 0.6 | 0 ± 0 | 6.7 ± 0.6 |
| Cas | 13.4 ± 2.4 | 3.1 ± 0.2 | 1.0 ± 0.1 | 4.1 ± 0.5 |

cuadrados (área 2.25 $cm^2$) y luego fueron asépticamente transferidas a placas con agar previamente inoculadas con las diferentes microfloras nativas (Moreira y col., 2005). Los resultados obtenidos muestran un significativo efecto antimicrobiano a partir de la película compleja de Quit y Quit-Cas frente a la microflora nativa de queso y salame. Por otro lado, la película simple de Cas no mostró efecto antimicrobiano frente a ninguno de los alimentos ensayados. Hay varios factores que pueden afectar la acción antimicrobiana del quitosano, tales como su grado de deacetilación (Devlieghere y col., 2004; Dutta y col., 2009). El quitosano altamente deacetilado tiene mayor carácter antimicrobiano que aquellos con una mayor proporción de grupos amino acetilados, debido a su mayor solubilidad y densidad de carga (Dutta y col., 2009). Los resultados obtenidos indican que las fuertes interacciones (principalmente fuerzas electrostáticas) desarrolladas entre el Quit y Cas no alteraron la capacidad antimicrobiana del Quit. Al mismo tiempo, en la estructura Quit-Cas sigue habiendo una gran proporción de grupos amino disponibles (DD=98%) para interaccionar con la superficie bacteriana, cargada negativamente, alterando así la permeabilidad de su pared bacteriana e induciendo la pérdida de electrolitos intracelulares y proteínas, tal como lo describieron Dutta y col (2009).

*Ensayos in vivo:*

Para determinar la efectividad antimicrobiana de las películas comestibles se utilizaron 3 sustratos alimenticios: rodajas de zanahoria, queso cheddar y salame de Milano, sobre las cuales se aplicaron las películas de dos formas: por inmersión de las rodajas en las respectivas soluciones formadoras de películas o envolviendo las rodajas con las películas ya formadas. La Figura 11 muestra las soluciones formadoras de películas, mientras que la Figura 12 muestra los alimentos luego de ser recubiertos con las diferentes películas.

Las diferentes muestras alimenticias se almacenaron durante 5 días a 65% HR y 10ºC. Esta condición de almacenamiento fue seleccionada por ser la óptima para la retención de la capacidad antimicrobiana, de acuerdo a resultados obtenidos en ensayos preliminares. Durante el almacenamiento se determinó el efecto antimicrobiano de las películas aplicadas, realizando la cuantificación de diferentes poblaciones microbianas (bacterias mesófilas, psicrótrofilas y hongos y levaduras) sobre los alimentos tratados. En base a los resultados obtenidos es interesante destacar que las películas de caseinato ejercieron sólo un ligero efecto antimicrobiano sobre las muestras de carne recubiertas, con reducciones de aproximadamente 1.0-1.2 ciclos log, en comparación con las muestras control. Por otra parte, al utilizar queso como sustrato alimenticio se registró una significativa acción bactericida (reducciones de aproximadamente 3 log), tanto para hongos y levaduras como para bacterias mesófilas y psicrótrofilas, a los 5 días de almacenamiento.

Las películas de Quit y Quit/Cas aplicadas mediante inmersión o envoltura ejercieron una significativa acción bactericida sobre las tres poblaciones microbianas analizadas, sobre los 3 sustratos alimenticios en estudio (presentando reducciones entre 2 a 4.5 órdenes log). Las mayores reducciones fueron observadas en las muestras de queso (reducciones de 3.3 a 4.8 log) respecto a las

**Figura 11:** Soluciones formadoras de películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato (Pereda, 2010).

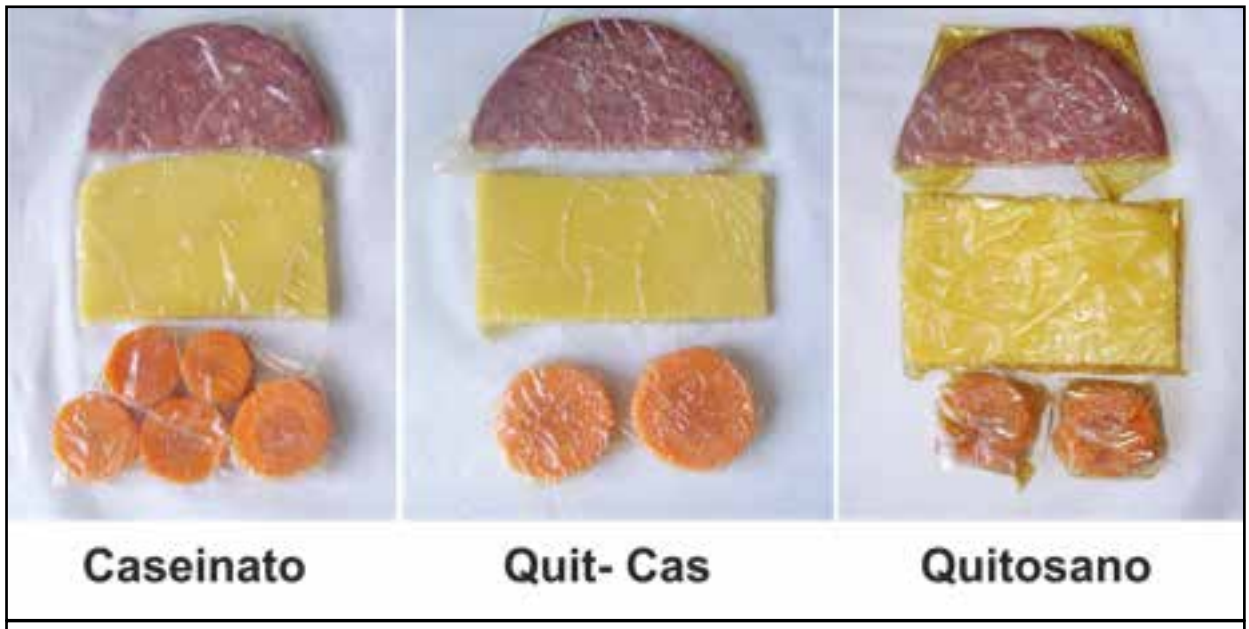


**Figura 12:** Alimentos de distinta naturaleza recubiertos con películas de caseinato, quitosano y quitosano/caseinato (Pereda, 2010).

muestras control.

Se pudo verificar que los dos tipos de tratamientos aplicados (inmersión de las rodajas en las soluciones formadoras de películas o cobertura con la película) sobre los alimentos resultaron aptos para controlar el crecimiento de hongos y levaduras, así como también de bacterias mesófilas y psicrótrofilas.

La reducción del crecimiento microbiano producido por las películas o recubrimientos de Quit y Quit-Cas es considerable y muy significativa si se la compara con otros métodos comúnmente aplicados para reducir la carga microbiana en los alimentos, por ejemplo: la aplicación de atmósferas modificadas (Amanatidou y col, 2000). Nuestros resultados coinciden con una gran cantidad de trabajos científicos que indican las ventajas de usar recubrimientos de quitosano para extender la vida útil de los alimentos, entre ellos los realizados por González-Aguilar y col. (2009), Durango y col. (2006), Park y col. (2005) y Jiang y col. (2005).

Las propiedades antimicrobianas de la mezcla Quit-Cas no sólo son significativamente superiores a las observadas con la película de caseinato pura, sino que también son superiores a las de los recubrimientos de quitosano puro. La muy significativa actividad antimicrobiana de la película compleja sugiere que la interacción iónica entre las dos macromoléculas no limitaría la actividad anti-microbiana propia del quitosano sino que, por el contrario, la potenciaría. Estos resultados resultan sumamente atractivos para las potenciales aplicaciones de las películas, sumados a los efectos sinérgicos observados en las propiedades mecánicas (tracción e impacto) y de absorción (ángulo de contacto, absorción de humedad) debidos a la formación del complejo polimérico.

## ■ ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN EN SUELO

También llevamos a cabo un ensayo para evaluar, a escala laboratorio, el proceso de degradación de las distintas películas en la microflora natural del suelo. El experimento lo realizamos en una serie de macetas de plástico conteniendo resaca de pino (Pinocha) y usando la microflora natural presente en el suelo (Di Franco y col., 2004; Álvarez y col., 2006). Las muestras de las distintas películas se cortaron en forma rectangular (2 cm x 3 cm) y se colocaron en el interior de bolsitas (5 cm x 4 cm) diseñadas con malla de acero inoxidable. Los agujeros de la malla permiten el acceso de los microorganismos y la humedad y las muestras degradadas pueden ser fácilmente extraídas de las mismas. Las bolsitas se enterraron a una profundidad de 5 cm de la superficie, de manera de asegurar la degradación aeróbica. La pinocha se mantuvo en condiciones saturadas de humedad mediante la aspersión periódica de agua destilada y la temperatura fue de 20 ± 2 ºC.

En la Figura 13 se muestra el aspecto macroscópico de las películas de caseinato en función del tiempo de entierro. Se nota claramente que el proceso de degradación es sumamente rápido y que concluye prácticamente al cuarto día de entierro, a diferencia de lo que ocurre con otras películas proteicas, como las de gluten de trigo, que desaparecen recién luego de los 50 días (Domenek y col., 2004), de gluten-proteína de soja y glicerol que duran en suelo aproximadamente 30 días

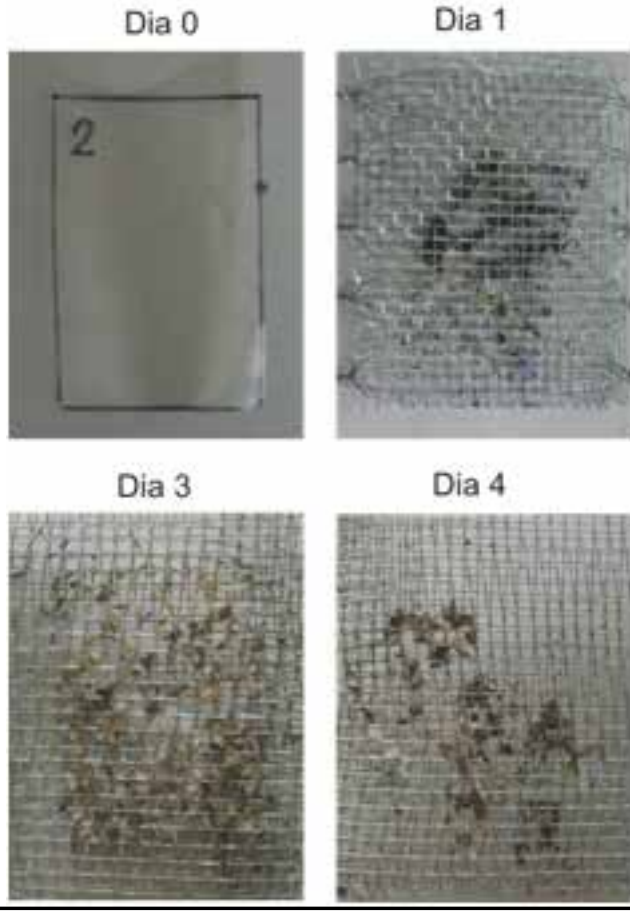


**Figura 13:** Deterioración macroscópica de películas de caseinato plastificadas luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación (Pereda, 2010).

(Park y col., 2000) y de gelatina sola o entrecruzada con almidón dialdehído que se deterioran dentro de los 15 días (Martucci y Ruseckaite, 2009). Por lo tanto, las películas de caseinato pueden clasificarse como materiales rápidamente degradables (Patil y col., 2000).

La razón principal de este comportamiento es la gran susceptibilidad de los materiales basados en proteínas a la acción de enzimas (proteasas) que son producidas por una amplia variedad de microorganismos (Martucci y Ruseckaite, 2009); además el caseinato de sodio es una proteína totalmente amorfa y prácticamente no posee estructura secundaria, lo que contribuye a que su biodegradación sea más rápida que la de otras proteínas. La humedad absorbida por la película favorece la proliferación microbiana en la tierra debido a la mayor disponibilidad de agua en el material, a partir de lo cual comienza la biodegradación.

También se enterraron en suelo las películas de Quit y de la mezcla Quit/Cas (Figura 14). Mientras que el caseinato se degrada principalmente por acción de las proteasas, el quitosano lo hace a través de diversas enzimas tales como: quitosanasa, lisozima y papaína (Harish Prashantha y col., 2005; Nair y Laucerin, 2007). El quitosano presenta un comportamiento biodegradativo más lento por su carácter antimicrobiano (los grupos amino cargados de manera positiva pueden interactuar y formar polielectrolitos complejos con los polímeros ácidos producidos en las superficies de las células bacterianas) a lo que se suma la regularidad de cadena polimérica que hace que los grupos hidrolizables estén más inaccesibles a las enzimas (Jo y col., 2005). En la Figura 15 se presentan los valores de pérdida de peso de las películas de quitosano enterradas y de la mezcla en función del tiempo de entierro.

Se observa claramente que las películas de quitosano pierden aproximadamente el 20% del material por biodegradación durante el primer día de entierro y no ocurren cambios ulteriores durante el resto de la primera semana. Por otro lado, ese período pseudo-estacionario en las muestras de la película híbrida se observa sólo hasta el tercer día de entierro; a partir de ese momento la velocidad de pérdida de masa aumenta significativamente.

En la Figura 14 se observa que la película de quitosano pareciera comenzar a deteriorarse visiblemente recién a los 130 días, mientras que la película compleja comienza a degradarse notablemente mucho antes, cerca de los 35 días. En conclusión, la película de quitosano demostró ser la más resistente al proceso de biodegradación en suelo, en comparación con las otras dos películas ensayadas. En general, tanto la velocidad como el grado de biodegradación del quitosano dependen del grado de deacetilación (Kean y Thanou, 2010): a menor grado de deacetilación mayores son la velocidad y susceptibilidad de las películas al proceso de degradación (Coma y col., 2002; Rajatzka y Boryniec, 1998).

## ■ OBSERVACIONES FINALES

En este artículo se resumieron sólo algunos de los resultados que obtuvimos para películas proteicas orientadas al envasado de alimen-

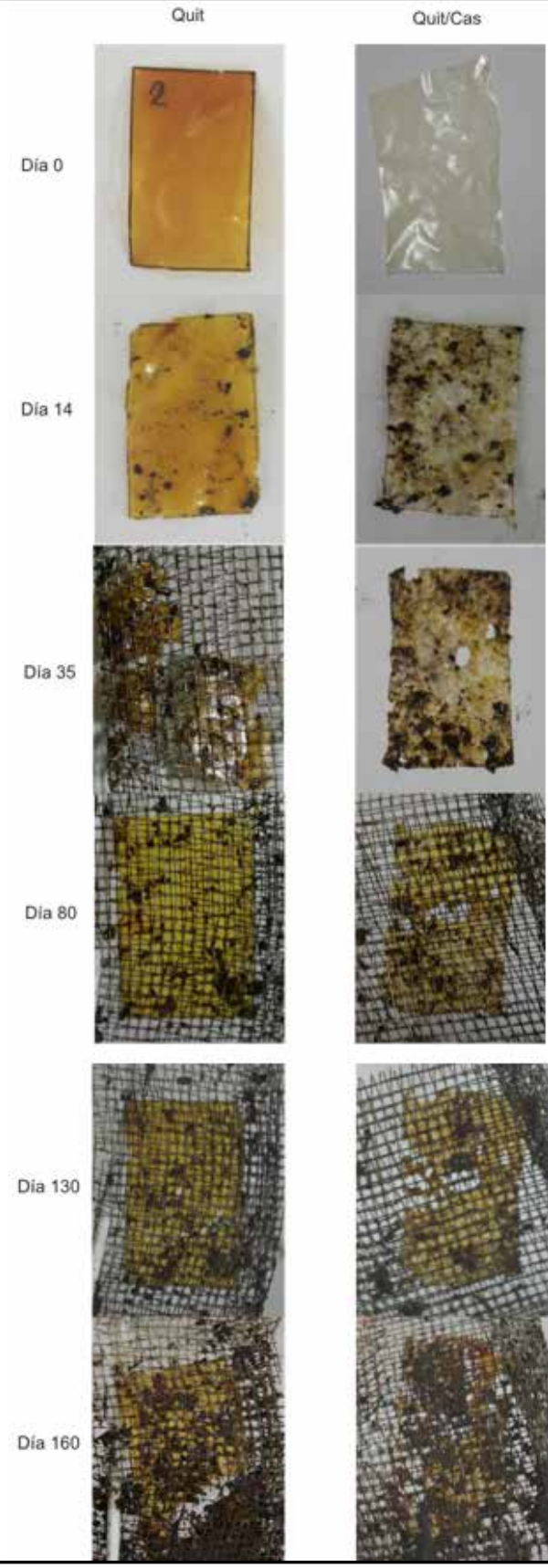


**Figura 14:** Deterioración macroscópica de películas de Quit y Quit/Cas plastificadas, luego de diferentes tiempos de exposición en el medio de biodegradación (Pereda, 2010).

tos, centrándonos en el sistema compuesto que nos llevó a la obtención de un complejo polielectrolítico con propiedades destacadas. Sin embargo, la adecuada combinación de resistencia mecánica, flexibilidad y baja permeabilidad al vapor de agua en películas basadas en caseinato de sodio puede obtenerse adoptando otras metodologías, por ejemplo, entrecruzando la proteína mediante tratamientos químicos o térmicos o agregando sustancias hidrofóbicas (aceites, grasas) a la solución formadora [Pereda y col., 2010; Pereda y col., 2010b; Pereda y col., 2012].

Nuestros resultados mostraron como más ventajoso un simple tratamiento térmico de las películas de caseinato por sobre el entrecruzamiento químico con glutaraldehído (GTA), tanto por las propiedades finales alcanzadas, como por la simplicidad del proceso de calentamiento de la película. Encontramos que al someter las películas de caseinato a 95ºC durante 6 h se pueden obtener redes suficientemente entrecruzadas y con buena capacidad de deformación. Este tratamiento demostró ser efectivo para mejorar la estabilidad térmica y reducir la hidrofilicidad, esta última reflejada en las mediciones de absorción de agua y permeabilidad al vapor de agua, aumentando además la integridad de las películas en ambiente acuoso (TSM), en comparación con las películas control de caseinato de sodio. De hecho, consideramos que el tratamiento térmico de películas de caseinato es una alternativa valiosa y atractiva para mejorar las propiedades de las películas basadas en caseinato de sodio y sin las complicaciones inherentes asociadas con el uso de GTA (tóxico a altas concentraciones).

En conclusión, mediante la aplicación de diversas alternativas es posible aprovechar las interesantes

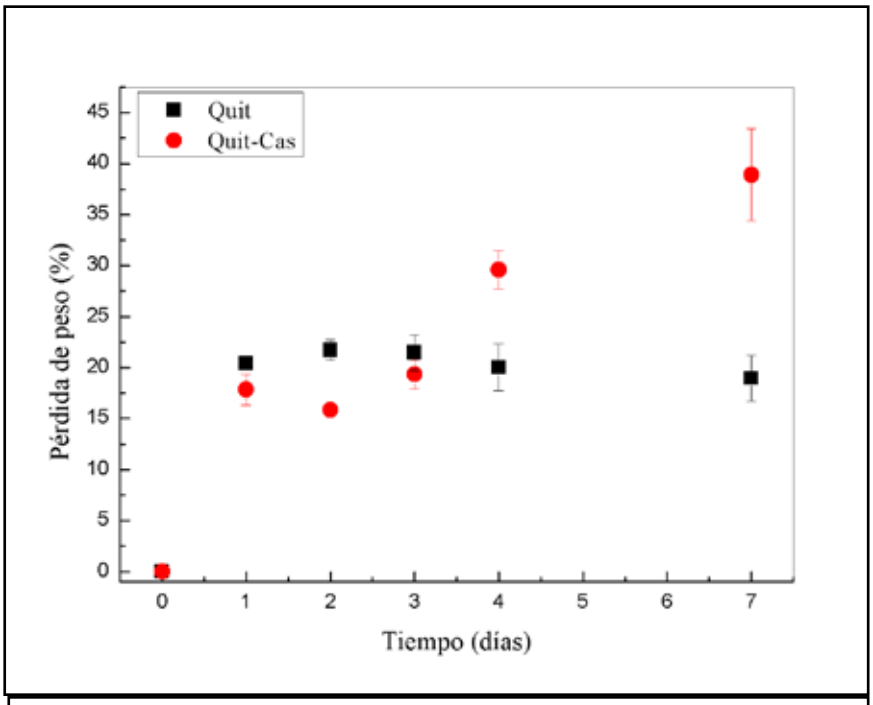


**Figura 15:** Pérdida de peso en función del tiempo de degradación durante el entierro en suelo de películas de Quit y Quit/Cas plastificadas.

propiedades como formadores de películas del caseinato de sodio, del quitosano o de sus mezclas para formular materiales aplicables al envasado y recubrimiento de alimentos.

## ■ GLOSARIO

**Bacterias mesófilas:** Grupo de bacterias que se desarrollan a temperaturas entre 30-40 ºC.

**Bacterias psicrótrofilas (o criófilas):** Son organismos extremófilos que tienen capacidad para reproducirse y crecer a bajas temperaturas (-15 a 10°C).

**Complejos poliméricos polielectrolíticos:** Son estructuras que resultan de la agregación/interacción de macromoléculas cargadas electrostáticamente con grupos ionizables complementarios (positivos y negativos).

**Deformación plástica:** Deformación que origina un cambio permanente de forma o dimensión de un material

**Deformación última:** Incremento de longitud máxima (con respecto a la longitud inicial) que sufre la probeta en el ensayo de tracción; al sobrepasar esta longitud la probeta se rompe.

**Degradación aeróbica:** Es la degradación que se lleva a cabo en un ambiente rico en oxígeno diatómico.

**Energía de iniciación:** Representa la energía requerida para iniciar la fractura de una probeta bajo condiciones normalizadas.

**Energía de propagación:** Representa la energía requerida para que la fisura iniciada se propague (crezca, se extienda) hasta producir el colapso (ruptura, perforación de la probeta) del material.

**Ensayo de tracción:** Consiste en someter a una probeta normalizada a un esfuerzo axial de tracción, el que se incrementa hasta que se produce la rotura de la probeta.

**Esfuerzo de fluencia:** Es el esfuerzo máximo que se puede desarrollar en un material sin causar una deformación plástica.

**Estructura secundaria de las proteínas:** Es el plegamiento que la cadena polipeptídica adopta gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre los átomos que forman el enlace peptídico.

**Hongos:** Son organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa.

**Levaduras:** Son hongos microscópicos unicelulares, importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos compuestos orgánicos, principalmente los azúcares simples, produciendo distintas sustancias.

**Módulo elástico o Módulo de Young:** Es un parámetro que cuantifica la rigidez de un material elástico. Se calcula a partir de la respuesta esfuerzo-deformación obtenida a bajas deformaciones en un ensayo de tracción del material.

**Proteasas (o peptidasas):** Son enzimas, moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, dando lugar a la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas.

**Resistencia al impacto:** Esta propiedad está relacionada con la capacidad de un material a absorber energía durante el impacto de una carga (choque).

**Resistencia en tracción:** Carga máxima resistida por el material (durante el ensayo de tracción) antes de su rotura, dividida por la sección inicial de la probeta.

**Temperatura de transición vítrea:** Es una de las propiedades específicas que mejor contribuyen a caracterizar a los polímeros. Se define como la temperatura a la que un material amorfo (o la fase amorfa de un material) sufre una transición desde un estado vítreo (por debajo de esa temperatura) a un estado de goma (por encima de la temperatura de transición vítrea). Los vidrios orgánicos tienen temperaturas de transición vítrea mayores que la ambiente, mientras que las gomas tienen una temperatura de transición vítrea frecuentemente bien por debajo de 0°C.

**Tracción:** Es la acción mediante la cual se somete un cuerpo a un esfuerzo por la aplicación de dos fuerzas que actúan en sentido opuesto y tienden a estirarlo.

**Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml o g):** Es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un dado taxón (grupo de organismos emparentados) en un volumen/peso de muestra dado.

**Volumen libre (de un polímero):** Es el volumen no ocupado efectivamente por las cadenas del polímero. La movilidad de las cadenas poliméricas aumenta con el volumen libre. Por esa razón, los polímeros con mayor fracción de volumen libre tienen una temperatura de transición vítrea más baja.

## ■ BIBLIOGRAFÍA.


Álvarez, V.A., Ruseckaite, R.A., Vázquez, A. (2006) Degradation of sisal fibre/Mater Bi-Y biocomposites buried in soil. Polym Degrad Stab 91: 3156-3162.

Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L. G. M., Smid, D. (2000) High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots. Journal of Food Science 65: 61–66.

Anker, M., Stading, M., Hermansson, A.-M. (1998) Mechanical Properties, Water Vapor Permeability and Moisture Contents of b-Lactoglobulin and Whey Protein Films Using Multivariate Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 1820-1829.

Arvanitoyannis, S., Nakayama, A., Aiba, S. (1998) Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. Carbohydrate Polymers 37: 371- 382.

Audic J-L, Chaufer B. (2005) Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. European Polymer Journal 41: 1934–1942.

Barreto P.L.M., Pires A.T.N., Soldi V. (2003) Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. Polym Degrad Stabil 79: 147–152.

Barreto, P.L.M., Roeder, J., Crespo, J.S., Maciel, G.R., Terenzi, H., Pires, A.T.N., Soldi, V. (2003) Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. Food Chemistry 82: 425–431.

Bergo, P., Sobral P.J.A. (2007) Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. Food Hydrocolloids 21: 1285–1289.

Bigi, A., Panzavolta, S., Rubini K. (2004) Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. Biomaterials 25: 5675–5680.

Butler, B.L., Vergaro, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M., and Wiles, J. L. (1996) Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage. Journal of Food Science 61: 953-961.

Chick J, Ustunol, Z. (1998) Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. Journal of Food Science 63: 1024–1027.

Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Deschamps, A. (2002) Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of Food Science 67: 1162–1169.

Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N., Gómez-Guillén, M. C. (2009) Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. Food Hydrocolloids 23: 2094-2101.

Denavi, G., Tapia-Blácido D.R., Añón M.C., Sobral P.J.A., Mauri A.N., Menegalli F.C. (2009) Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. Journal of Food Engineering 90: 341–349.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004) Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. Food Microbiology 21: 703–714.

Di Franco, C.R., Cyras, V.P., Busalmen, J.P., Ruseckaite, R.A., Váz-

quez A. (2004) Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. Polym Degrad Stab 86: 95- 103.

Domenek, S. Feuilloley, P. Gratraud, J. Morel, M.-H. Guilbert S. (2004) Biodegradability of wheat gluten based bioplastics. Chemosphere 54: 551–559.

Dumitriu, S., Magny, P., Montané, D., Vidal, P.F. Chornet, E. (1994) Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 9: 184-209.

Durango A.M., Soares N.F.F, Andrade N.J. (2006) Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. Food Control 17: 336-341.

Dutta, P.K., Tripathi, S, Mehrotra, G.K., Dutta J. (2009) Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry 114: 1173–1182.

Gennadios A. (2002) Protein-Based films and coatings. ed by Gennadios A. USA: CRC Press.

Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A.R., Rezayi, K., Razmi Rad, E., Milani J. (2007) Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. LWT 40: 1191–1197.

González-Aguilar G., Valenzuela-Soto E., Lizardi-Mendoza J., Martınez-Tellez M., Villegas-Ochoa M., Monroy-Garcıa I., Ayala-Zavala J. (2009) Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya. J Sci Food Agric 89: 15–23.

Guo, M.; Fox, P.F.; Flynn, A., Mahammad, K.S. (1989) Heat-induced changes in sodium caseinate. J Dairy Res 56: 503–512.

Harish Prashantha, K.V., Lakshmanb, K., Shamalab, T.R., Tharanathan R.N. (2005) Biodegradation of chitosan-graft-polymethylmethacrylate films K.V. Inter-national Biodeterioration & Biodegradation 56: 115–120.

Hernández-Muñoz, P., Hernández, R.J. (2002) Effect of Storage and Hydrophilic Plasticizers on Functional Properties of Wheat Gluten Glutenin Fraction Films. In Worldpak 2002, 13th Proc IAPRI Conf.

Hernández-Muñoz, P., López-Rubio, A., Lagarón, J.M., Gavara, R. (2004) Formaldehyde Cross-Linking of Gliadin Films: Effects on Mechanical and Water Barrier Properties. Biomacromolecules 5: 415-421.

Hirano, S. (1989) Production and application of chitin and chitosan in Japan. Chitin and Chitosan, A. Skjak-Braek & Sanford. Editor: Elsevier Science Publishing Co. London 37-43.

Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., Gontard, N. (2001) New plasticizers for wheat gluten films. Eur Polym J 37: 1533.

Jiang, Y., Li, Y., Jiang, W. (2005) Effects of chitosan on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. LWT 38: 757–761.

Jo, C., Kang, H., Lee, N.Y., Kwon, J. H., Byun M. W. (2005) Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. Radiation Physics and Chemistry 72: 745–750.

Kean, T., Thanou, M. (2010) Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, Adv. Drug Deliv. Rev. 62: 3-11.

Kim, C.T., Kim, C.J., Cho, Y.J., Chun, B.Y. (2005) AIChE Ann. Meeting Conf. AQ2 Proc. 8877.

Li, Q., Duna, E.T., Grandmaison, E.W., Goosen, M.F.A. (1992) Applications and properties of chitosan. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 7: 370-97.

Lieske, B., Konrad, G. (1994) Thermal modification of sodium-caseinate. 2. Influence of temperature and pH on nutritive properties. Milchwissenschaft 49: 71–74.

McHugh, T.H., Krochta, J.M. (1994) Sorbitol vs. glycerol plasticized whey protein edible film: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42: 841–845.

Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. (2004) Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. Carbohydrate Polymers 56: 129-135.

Mangavel, C., Barbot, J., Guéguen, J., Popineau, Y. (2003) Molecular Determinants of the Influence of Hydrophilic Plasticizers on the Mechanical Properties of Cast Wheat Gluten Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 1447-1452.

Martucci, J.F., Ruseckaite R.A. (2009) Tensile Properties, Barrier Properties and Biodegradation in Soil of Compression–Molded Gelatin-Starch Dialdehyde Films.

Journal of Applied Polymer Science 112: 2166-2178.

Maté, J.I., Krochta, J.M. (1996) Comparison of Oxygen and Water Vapor Permeabilities of Whey Protein Isolate and beta-Lactoglobulin Edible Films. J Agric Food Chem 44: 3001-3004.

Moreira M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. (2005) Inhibitory Parameters of Essential Oils to Reduce a Foodborne Pathogens. LWT 38: 565-570.

Mujica Paz, H., Guillard, V., Reynes, M., Gontard N. (2005) Ethylene permeability of wheat gluten film as a function of temperature and relative humidity. Journal of Membrane Science 256: 108–115.

Nair, L.S., Laurencin, C.T. (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci 32: 762–798.

Nelson, L.N., Cox, M.M. Lehninger, A.L. (2000) Principles of Biochemistry. 3rd ed., New York: Worth Publishers.

Park, S., Hettiarachchy, N., Were, L. (2000) Degradation behavior of soy protein–wheat gluten films in simulated soil conditions. J Agric Food Chem 48: 3027–3031.

Park, S., Stan, S.D., Daeschel, M.A., Zhao, Y. (2005) Antifungal coatings on fresh strawberries (Fragaria x ananassa) to control mold growth during cold storage. Journal of Food Science 74: 202-207.

Patil, R.D., Dalev, P.G., Mark, J.E., Vassileva, E., Fakirov, S. (2000) Biodegradation of chemically modified gelatin films in lake and river waters J Appl Polym Sci 76: 29.

Pereda, M., Aranguren, M.I., Marcovich, N.E. (2008) Characterization of chitosan/ caseinate films. Journal of Applied Polymer Science 107: 1080-1090.

Pereda, M., Aranguren, M.I., Marcovich, N.E. (2009) Water vapor absorption and permeability of films based on chitosan and sodium caseinate, Journal of Applied Polymer Science 111: 2777-2784.

Pereda, M., Aranguren, M.I., Marcovich, N.E., (2010) Effect of crosslinking on the properties of sodium caseinate films. Journal of Applied Polymer Science 116: 18-26.

Pereda, M., Aranguren, M.I., Marcovich, N.E. (2010b) Caseinate films modified with tung oil. Food Hydrocolloids 24: 800-808.

Pereda, M. (2010) Polímeros naturales como materiales para envases de alimentos, Tesis doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ingeniería.

Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., Martucci, J.F. (2011) Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity, Food Hydrocolloids 25: 1372-1381.

Pereda, M., Amica, G., Marcovich, N.E. (2012) Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films, Carbohydrate Polymers 87: 1318-1325.

Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., Guilbert, S. (2003) Study of wheat plasticization with fatty acids. Polymer 44: 115–122.

Prodpran T., Benjakul, S. Artharn A. (2007) Properties and microstructure of protein-based film from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle as affected by palm oil and chitosan incorporation. International Journal of Biological Macromolecules 41: 605–614.

Ratajska, M. Boryniec S. (1998) Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. Reactive & Functional Polymers 38: 35–49.

Remuñán-López, C., Portero, A., Vila-Jato, J L., Alonso, M J. (1998) Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. Journal of Controlled Release 55: 143–152.

Sothornvit, R., Krochta, J.M. (2000) Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of b- Lactoglobulin Films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 6298-6302.

Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Tharanathan, R.N. (2007) Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. Food Hydrocolloids 21: 1113–1122.

Srinivasa, P.C., Tharanathan, R.N. (2007) Chitin/chitosan-safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. Food Rev Int 23: 53.

Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009) Characterization of chitosan-oleic acid composite films. Food Hydrocolloids 23: 536-547.

Wong, D.W.S., Gastineau, F.A., Gregorski, K.S., Tillin, S.J., Pavlath, A.E. (1992) Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. Journal of Agricul-tural and Food Chemistry 40: 540-544.